

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

**Impacto de la desincronización circadiana en el metabolismo del ratón
*Neotomodon alstoni***

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Biología

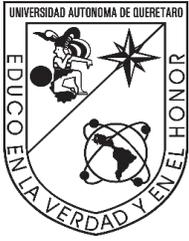
Presenta

Tania Guillén Casas

Dirigida por:

Dr. Manuel Miranda Anaya

Santiago de Querétaro, Qro. Junio 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**“Impacto de la desincronización circadiana en el metabolismo del ratón
Neotomodon alstoni”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta

Tania Guillén Casas

Exp. 253222

Dirigido por:

Dr. Manuel Miranda Anaya

Manuel Miranda Anaya
Presidente

Firma

Marco Antonio Sánchez Ramos
Secretario

Firma

Moisés Pérez Mendoza
Vocal

Firma

Alma Dalía Luna Moreno
Vocal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Abril, 2021
México

Resumen

El sistema de reloj circadiano participa en ciclos conductuales, fisiológicos y moleculares, que se sincronizan de acuerdo a ciclos externos del medio ambiente (*Zeitgebers*). En mamíferos existe un oscilador circadiano central ubicado en el hipotálamo, llamado núcleo supraquiasmático (NSQ), así como osciladores periféricos ubicados en el resto de los órganos del cuerpo. Estos osciladores, a nivel molecular, consisten en asas de retroalimentación transcripcional-postraduccionales. La desincronización del sistema circadiano puede generar grandes consecuencias para la salud al tener un papel fundamental en la fisiología. El ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*) ha servido como modelo dentro de la cronobiología en los últimos años para evaluar la actividad locomotora, variaciones pro-oxidantes, diferencias metabólicas entre hembras y machos, así como la susceptibilidad a desarrollar obesidad. En este trabajo se buscó determinar si la exposición a un fotoperiodo irregular prolongado, no utilizado previamente, produce cambios en los parámetros metabólicos de ratones delgados *N. alstoni*. La curva de tolerancia a la glucosa no mostró diferencias significativas entre grupos estudiados por lo que el protocolo no afectó la regulación glucémica; por otro lado, se encontró una disminución significativa de la expresión de la proteína PPAR α en hígado de ratones sometidos al protocolo de desincronización lo cual estaría involucrado en una alteración en la regulación metabólica lipídica hepática.

Palabras clave: Desincronización circadiana, *Neotomodon alstoni*, tolerancia a la glucosa, PPAR α hepático.

Summary

The circadian system participates in behavioral, physiological and molecular cycles that synchronizes according external cycles of the environment (*Zeitgebers*). In mammals there is a central circadian oscillator localized in the hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus (SCN), as well as peripheral oscillators localized in the rest majority tissues of the body. These oscillators, in a molecular level, consist in feedback handles transcriptional-postranslational. The circadian system desynchronization is linked to health consequences altering physiology. The volcano mouse (*Neotomodon alstoni*) has been a model in chronobiology in the last years to evaluate locomotor activity, pro-oxidant variations, metabolic differences between males and females, as well as their susceptibility to develop obesity. In this study we test if an irregular photoperiod exposition, not previously used, along three months can produce changes in metabolic parameters of lean mice *N. alstoni*. About glucose tolerance curve, there were no differences between study groups, however, indicating that the protocol did not affect the glycemic regulation. On the other hand, there was a significant decrease in the hepatic PPAR α protein expression in mice with the circadian desynchronization, which would be involucrate in an alteration in the hepatic lipid metabolic regulation.

Key words: Circadian desynchronization, *Neotomodon alstoni*, glucose metabolism, hepatic PPAR α .

Dedicatorias

A mis padres, por ser siempre mi apoyo incondicional y a mis amigos Kari, Nayeli, Eliseo, Sara y Dani, por hacer más bonita esta etapa de mi vida.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

Agradecimientos

A mis profesores de la licenciatura por todas sus enseñanzas y porque, con sus aportaciones dentro de su respectiva área, siempre me mostraron la importancia de la biología y me motivaron a continuar en esta área de la ciencia.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave del proyecto IN200620 DGPA, UNAM, durante la realización de esta tesis, por brindarme la oportunidad de obtener una beca.

A mi director de tesis, persona e investigador admirable, el Dr. Manuel Miranda Anaya por permitirme entrar, trabajar y aprender en su laboratorio, así como por todo su tiempo, apoyo, paciencia y motivación para que este trabajo fuera posible.

A mis sinodales, la Dra. Alma Dalia Luna Moreno, el Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos y el Dr. Moisés Pérez Mendoza, por aceptar participar en la revisión de este trabajo, por todos sus aportes, sugerencias y comentarios, así como por el tiempo dedicado.

A la Dra. Elvira Arellanes Licea, de quien estoy inmensamente agradecida por todo su apoyo y de quien aprendí muchas cosas durante mi estancia en el laboratorio, y que, como persona e investigadora, me es un ejemplo a seguir.

A la Dra. Dalia Luz de Ita Pérez, con quien realicé mi trabajo de servicio social porque sin saberlo, me inclinó a interesarme en esta rama de la biología y por ser, una figura de inspiración tanto personal como profesional.

ÍNDICE

Página

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice.....	v
Índice de figuras.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Diversidad de ritmos biológicos.....	2
2.2 El sistema circadiano en los seres vivos.....	3
2.3 Oscilador y sincronización.....	4
2.4 Oscilador maestro y osciladores periféricos en mamíferos.....	6
2.5 Maquinaria molecular circadiana en mamíferos	7
2.6 La luz como sincronizador e impacto en la maquinaria molecular.....	9
2.7 Alimentación como sincronizador.....	13
2.8 Desincronización circadiana.....	14
2.9 Metabolismo y sistema circadiano.....	16
2.10 Metabolismo lipídico y los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs).....	18
2.11 PPARs y el reloj circadiano.....	24
2.12 Metabolismo de la glucosa y el reloj circadiano.....	26
2.13 La curva de tolerancia a la glucosa como herramienta de estudio del metabolismo.....	29
2.14 <i>Neotomodon alstoni</i> como modelo de estudio	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS	
5.1 Objetivo general.....	32
5.2 Objetivos particulares.....	32
6. MÉTODOS	

6.1 Animales de laboratorio.....	33
6.2 Protocolo de desincronización	33
6.3 Curva de tolerancia a la glucosa.....	35
6.4 Sacrificio y obtención de hígado.....	35
6.5 Procesamiento de hígado.....	35
6.6 Cuantificación de concentración de proteínas.....	36
6.7 Western Blot.....	37
6.8 Escaneo de membranas.....	38
6.9 Análisis de datos.....	39
7. RESULTADOS	
7.1 Tolerancia a la Glucosa.....	39
7.2 Expresión relativa de PPAR α hepático.....	43
8. DISCUSIÓN	
8.1 Tolerancia a la glucosa.....	45
8.2 Expresión relativa de PPAR α hepático.....	47
9. CONCLUSIÓN	51
10. REFERENCIAS	53

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura 1. Ritmo biológico.....	3
Figura 2. Maquinaria molecular del reloj circadiano.....	9
Figura 3. Luz como sincronizador.....	10
Figura 4. Luz como regulador en las neuronas del NSQ.....	12
Figura 5. Mecanismo molecular de PPAR α en el reloj circadiano.....	26
Figura 6. Sistema de ambiente controlado para ratones en experimentación.....	34
Figura 7. Actograma representativo del protocolo de desincronización.....	34
Figura 8. Peso corporal entre grupos experimentales.....	40
Figura 9. Curva de tolerancia a la glucosa.....	41
Figura 10. Comparación promedio del área bajo la curva.....	42
Figura 11. Comparación densitométrica de PPAR α en hígado.....	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Área total bajo la curva.....	42
Cuadro 2. Promedios grupales del área bajo la curva.....	42
Cuadro 3. Prueba Mann Whitney del área bajo la curva.....	43
Cuadro 4. Densitometría de PPAR α en hígado de <i>N. alstoni</i>	43
Cuadro 5. Prueba Mann Whitney para expresión de PPAR α hepático.....	45
Anexo 1. Permiso del comité de bioética.....	52

1. INTRODUCCIÓN

El planeta tierra sigue un curso rotacional sobre su propio eje, haciendo que una vuelta completa con respecto al sol tenga una duración aproximada de 24 horas, generando así variaciones diarias en las condiciones medioambientales como la luz, la temperatura y la humedad. En el planeta, la duración de luz solar es variable según las estaciones del año debido a la inclinación del eje de rotación respecto a la incidencia de la radiación solar y por tanto a la ubicación latitudinal. Los cambios entre el día y la noche han cautivado a la humanidad desde hace mucho tiempo, pues hace más de 5500 años, los egipcios erigieron obeliscos que se usaron como relojes de sol (Refinetti, 2016). Por otro lado, hace unos 3000 años, los sacerdotes sumerios fueron de los primeros en darle la importancia al conocimiento preciso del tiempo, por lo tanto, la mayoría de los templos mesopotámicos, como el Zigurat en Babilonia, tenían un largo eje Este-Oeste para hacer observaciones de constelación estelar, la cual influenciaría en la planificación, la anticipación y el seguimiento del tiempo (Daan, 2009). Los humanos somos conscientes de los cambios internos periódicos y el mundo vivo que nos rodea, como los propios patrones de sueño y vigilia. Al ser tan evidente, esto prácticamente no atrajo la atención científica, hasta que Aristóteles escribió sobre el comportamiento del sueño y la vigilia (citado en Daan, 2009). En el siglo IV a. C., Androsthene de Thasus, registró sus observaciones de los movimientos diarios de las plantas, considerándose como el primer registro sobre observaciones de fisiología circadiana. Entre otros registros de la antigüedad se encuentran el de los médicos Hipócrates y Galeno; sin embargo, pasaron más de 2000 años hasta que se hizo el primer intento experimental de entender la verdadera naturaleza de este fenómeno (citado en Refinetti, 2016). En 1729, el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous de Mairan mostró evidencias de que los seres vivos mostraban respuestas rítmicas de manera endógena, sin embargo, fue hasta que Augustin de Candolle (1778-1841) daría la primera

descripción de investigación de la ritmicidad endógena en los organismos y que ello tenía efecto en su adaptación al medio. A partir de entonces, que se fue fundando lo que más adelante dio lugar a la cronobiología. En 1960 se integraron diversas disciplinas en un congreso de Cold Spring Harbor, donde diversos investigadores contribuyeron para la consolidación de la cronobiología y que ha brindado una mejor comprensión con respecto al tiempo biológico, así como de su impacto e importancia en los seres vivos (Refinetti, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1 Diversidad de ritmos biológicos

La cronobiología es una ciencia que estudia objetivamente los fenómenos y mecanismos de la estructura biológica de la medición del tiempo, incluidas las manifestaciones rítmicas de la vida (Mehling y Fluhr, 2006). Los ritmos biológicos son un componente cíclico de una variable biológica obtenida en función del tiempo y pueden abarcar varios órdenes de magnitud, desde microsegundos hasta decenas de miles de años (Mehling y Fluhr, 2006; Refinetti, 2016). Se caracterizan por un periodo y amplitud con una fase de máxima ocurrencia (Ver Figura 1). De esta manera, el periodo representa el tiempo que se necesita para completar un ciclo; mientras que la amplitud es la magnitud o fuerza de un ritmo, desde la línea de base cero hasta el pico o la depresión del modelo matemático utilizado para describir el ritmo, es decir, es la diferencia en el nivel entre los valores pico y mínimo (Poggiogalle, et al. 2017). Finalmente, aunque la fase se refiere a cualquier estado repetible en un ciclo, un ritmo biológico muestra una fase de máxima ocurrencia en un contexto dado (Koukkari y Sothorn, 2006).

En general, los ritmos biológicos se pueden orquestar de dos maneras diferentes, por un lado, pueden generarse directamente por cambios en las señales externas regulares y por otro, los organismos pueden poseer sistemas de temporización internos de la duración del período

respectivo que se ajustan a las señales externas. Dentro de los ritmos biológicos, se pueden encontrar los ritmos ultradianos, como lo son procesos celulares, respiración y circulación, que presentan periodos de menos de 20 horas; los ritmos infradianos, como la hibernación y la muda, con periodos de más de 28 horas; y los ritmos circadianos, con periodos de alrededor de las 24 horas, representando así tres dominios (Schwartz y Daan, 2017). Los mecanismos de formación de ritmos infradianos y ultradianos difieren del sistema de ritmo circadiano, pues los primeros no modifican sus períodos y fases en condiciones de iluminación permanente, en contraste con los ritmos circadianos (Diatroptov, et al. 2019). Al final estos tres ritmos se acoplan de forma tal que interactúan en una red y se expresan de manera simultánea en el mismo orgánulo o célula (Schwartz y Daan, 2017).

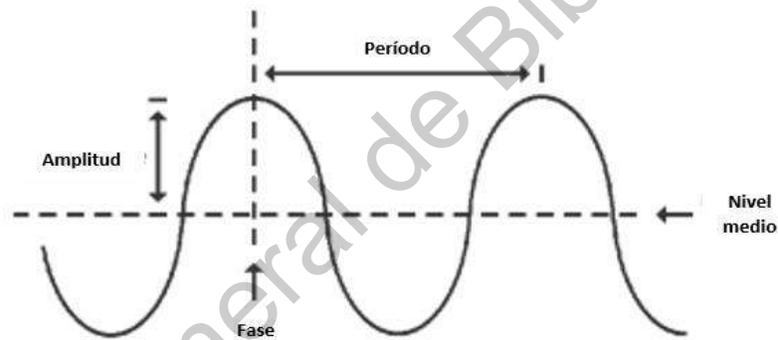


Figura 1. Elementos que conforman a un ritmo biológico (Refinetti, 2016).

2.2 El sistema circadiano en los seres vivos

Los ritmos circadianos, son aquellos que se generan aproximadamente cada 24 horas, son los que dominan entre los ritmos biológicos ultradianos e infradianos, así como los más estudiados; se ha demostrado que están presentes en la mayoría de los seres vivos, desde cianobacterias hasta vertebrados complejos como los mamíferos, mostrando variaciones entre especies. Estos ritmos se ven implicados en ciclos conductuales, fisiológicos y moleculares, y

se caracterizan principalmente por ser producidos mediante procesos endógenos a los organismos, es decir, que la ritmicidad persiste aún en ausencia de señales periódicas externas. Otra característica, es que se pueden alinear o sincronizar a ciclos externos del medio ambiente como los de la luz o la humedad (Weaver, 2016; Aguilar, et al. 2015). Por otro lado, la periodicidad del ritmo compensa las fluctuaciones de temperatura, que por sí misma, puede ser un factor de cambio importante en algunos organismos, ya que puede alterar la conducta y diversos estados fisiológicos, sin embargo, en el caso de los mamíferos, se puede mantener constante la temperatura del cuerpo en todo momento. De esta manera, la compensación de la temperatura en el periodo del ritmo circadiano, garantiza que el reloj funcione a su velocidad natural independientemente de los cambios de temperatura del cuerpo o del medio ambiente (Refinetti, 2016).

Hay dos puntos principales que subrayan la importancia adaptativa del sistema circadiano, la sincronización con el entorno y la sincronización interna. Al generarse una sincronización con el entorno se ve favorecida la obtención de recursos en el momento del día más oportuno de acuerdo con la especie. Por otra parte, se genera la sincronización de procesos fisiológicos que son requeridos en determinadas fases del día y que permiten una optimización vital de los organismos. De esta manera, hay una modulación activa en cuanto a los ajustes fisiológicos durante las 24 horas del día (Weaver, 2016).

2.3 Oscilador y sincronización

Las fluctuaciones rítmicas del medio han facilitado el desarrollo de mecanismos de tiempo que funcionan para generar, en los organismos, una representación interna de estas fluctuaciones, siendo así, se han descrito los osciladores biológicos internos (Floessner y Hunt, 2017).

El término oscilador circadiano, fue acuñado por Franz Halberg en 1959, sin embargo, fue hasta 1980 que se propuso la estructura general de un oscilador biológico, circadiano o no, mediante el análisis de oscilaciones químicas y biológicas bien caracterizadas (Aguilar, et al. 2015; Xie, et al. 2019). De esta manera y mediante años de investigación, se ha demostrado que el oscilador circadiano en los mamíferos se encuentra en todas las células del cuerpo y tiene un periodo de funcionamiento libre de aproximadamente 24 horas, lo que le permite a los organismos adaptarse a un entorno fluctuante (Xie, et al. 2019). Entonces, el oscilador circadiano es un mecanismo biológico que proporciona señales de tiempo al organismo, por lo tanto, el comportamiento, los procesos fisiológicos y los procesos celulares se ven afectados por estos mecanismos oscilantes (Floessner y Hunt, 2017). En los mamíferos, el oscilador circadiano maestro es el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, sin embargo, se han identificado tejidos en el resto del cuerpo que son capaces de llevar oscilaciones circadianas autosostenidas, las cuales, son específicas del tejido (Koukkari y Sothorn, 2006).

El sistema de tiempo circadiano interno, interacciona y es arrastrado, principalmente, por señales de temporización externas como la luz o la comida, y estas señales son llamadas "Zeitgebers" (del vocablo alemán *Zeit= tiempo, geber= dador*), que sincronizan la red del reloj interno con el ciclo ambiental (Heyde y Oster, 2019; Xie, et al. 2019). La diferencia más fundamental entre el oscilador central y los osciladores periféricos, es la capacidad de estos últimos para responder a señales de temporización impulsadas por el NSQ y por otro lado, la del NSQ es su ceguera a esas señales periféricas, en cambio, su arrastre es generado por un rango limitado de estímulos ambientales, ya que responde principalmente a la luz ambiental, mientras que los osciladores periféricos responden a una combinación compleja y redundante de estímulos nerviosos directos, señales hormonales y señales indirectas dirigidas a la

actividad, como a la temperatura corporal y al momento de la ingesta de alimentos (Buhr y Takahashi, 2013).

El núcleo supraquiasmático (NSQ) es un oscilador que transmite su ritmicidad mediante vías de salida neuroanatómicas, que conduce a ritmos fisiológicos y conductuales que coordinan los ritmos dentro y entre los tejidos periféricos. Para que exista cierto equilibrio de fase entre los distintos osciladores en todo el cuerpo, el NSQ debe orquestar señales de sincronización a los osciladores periféricos o "esclavos" (Chiesa, et al. 2015). En mamíferos, el sistema del tiempo circadiano es jerárquico, es decir, que los osciladores periféricos están sincronizados por una serie de ritmos de salida regulados por el NSQ, que incluyen la temperatura corporal, los niveles de corticoesteroides, niveles de melatonina, ingesta de alimentos e inervación autónoma directa; que, al parecer, al establecer un orden temporal interno adecuado, promueve salud y longevidad de los organismos (Weaver, 2016).

2.4 Oscilador maestro y osciladores periféricos en mamíferos

Desde los años 60 del siglo pasado hubo una búsqueda de osciladores circadianos funcionales que estuvieran integrados en estructuras anatómicas discretas. El concepto de la sincronización circadiana consistía en un marcapasos maestro que impusiera fase y periodo a otras estructuras en el organismo. Los osciladores circadianos se han localizado en distintas regiones del organismo, variando entre especie, pues distintos trabajos los han ubicado en el cerebro, ojo, glándula pineal y en el NSQ del hipotálamo (Aguilar, 2015). El concepto del reloj circadiano se modificó a sistema circadiano el cual está constituido por una entidad que mide el tiempo (oscilador), así como de elementos de entrada y los elementos de salida. Los elementos de entrada son los que permiten detectar y transmitir estímulos relevantes del reloj, es decir, la acción de ciertos factores ambientales que oscilan rítmicamente y que, en su

conjunto, actúan como la entrada del reloj, entre estos se encuentran el ciclo luz-oscuridad del día-noche, las horas de comida, el ejercicio programado, el sueño y los contactos sociales. Los elementos de salida del reloj son los que participan en la generación de respuestas fisiológicas a los centros neuroendocrinos y periféricos (Madrid, 2013).

El NSQ se compone de dos núcleos que están compuestos por miles de neuronas ubicadas a cada lado del tercer ventrículo en posición dorsal con respecto al quiasma óptico. El NSQ se divide en las subregiones “núcleo” y “cubierta”. El núcleo se distingue por presentar el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y péptido liberador de gastrina (GRP) en el núcleo retino-receptor, mientras que, en la cubierta, están células que expresan vasopresina arginina (AVP) (Madrid, 2013; Ma y Morrison, 2020).

Además del núcleo supraquiasmático, se ha demostrado que el sistema circadiano de mamíferos está compuesto por varios osciladores secundarios, conocidos también como osciladores periféricos, ubicándolos en casi todos los tejidos de un organismo, como la corteza cerebral, el hígado, el riñón, el tejido adiposo, los cuales son capaces de producir oscilaciones circadianas, en donde varias de las funciones fisiológicas de dichos osciladores están bajo control circadiano, pudiendo verse influidos o actuar de manera autónoma al NSQ (Chiesa, et al. 2015; Yang, et al. 2007).

2.5 Maquinaria molecular circadiana en mamíferos

Los osciladores circadianos a nivel celular son el resultado de la existencia de circuitos de retroalimentación positiva y negativa entre genes y proteínas, en donde los elementos positivos son proteínas que provocan la transcripción de genes (elementos negativos) que, finalmente, retroalimentan e inhiben la actividad transcripcional de los elementos positivos, generando, a través de otras varias vías interconectadas, una ritmicidad de alrededor de 24 horas (Buhr y

Takahashi, 2013). Los principales componentes identificados en el reloj de los mamíferos son el gen *Clock* (*Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput*) y el gen *Bmal1* (*brain and muscle ARNT-like protein 1*), siendo estos los elementos positivos, que codifican a *Bhlh-PAS* (*basic helix- loop – helix; Per- Arnt- Single*) y dará lugar a las proteínas que forman la extremidad positiva del circuito de retroalimentación. Por otro lado, los genes *Period 1, 2 y 3* (*Per1, Per2 y Per3*) y los genes *Criptocromo 1 y 2* (*Cry1 y Cry2*) son los elementos negativos (Madrid, 2013).

Como se muestra en la Figura 2, en el núcleo, el heterodímero proteico de elementos positivos, CLOCK y BMAL1, se unen a elementos específicos de ADN, que son las “Cajas E” (*E-box*) para dar inicio a la transcripción de los promotores de genes diana los cuales son los genes *Period* (*Per1, Per2 y Per3*) y *Criptocromo* (*Cry1 y Cry2*), los cuales una vez traducidos dan lugar a las proteínas *Period* (*PER1, PER2 y PER3*) y *Criptocromo* (*CRY1 y CRY2*). Las proteínas generadas se dimerizan e inhiben la actividad transcripcional del heterodímero CLOCK y BMAL1, lo que provoca que el ciclo se repita desde un nivel de baja actividad transcripcional. Para terminar la fase de represión y reiniciar el nuevo ciclo de transcripción, las proteínas PER y CRY generadas en un ciclo previo requieren ser degradadas. Por un lado, las proteínas PER son fosforiladas mediante la quinasa *CK1ε* (*Casein kinase 1 epsilon*) para su ubiquitinación por *βTrCP* (*β-transducing-repeat-containing protein*) y finalmente PER y CRY son degradadas por el proteosoma 26s (Buhr y Takahashi, 2013).

Existe un circuito de retroalimentación adicional para el caso de mamíferos en que el heterodímero CLOCK/BMAL1 se unen a las “cajas E” (*E-box*) en donde se da la transcripción de los genes huérfanos del receptor de hormonas nucleares (*Rev-Erb α y β*) y las proteínas del receptor huérfano relacionado con RAR (*ROR α, β y γ*). Las proteínas REV-ERB y ROR, compiten por los sitios de unión del elemento de respuesta del receptor huérfano relacionado

con el ácido retinoico (RORE) dentro del promotor Bmal1, en donde las proteínas ROR inician la transcripción de Bmal1 y las proteínas REV-ERB lo inhiben (Buhr y Takahashi, 2013).

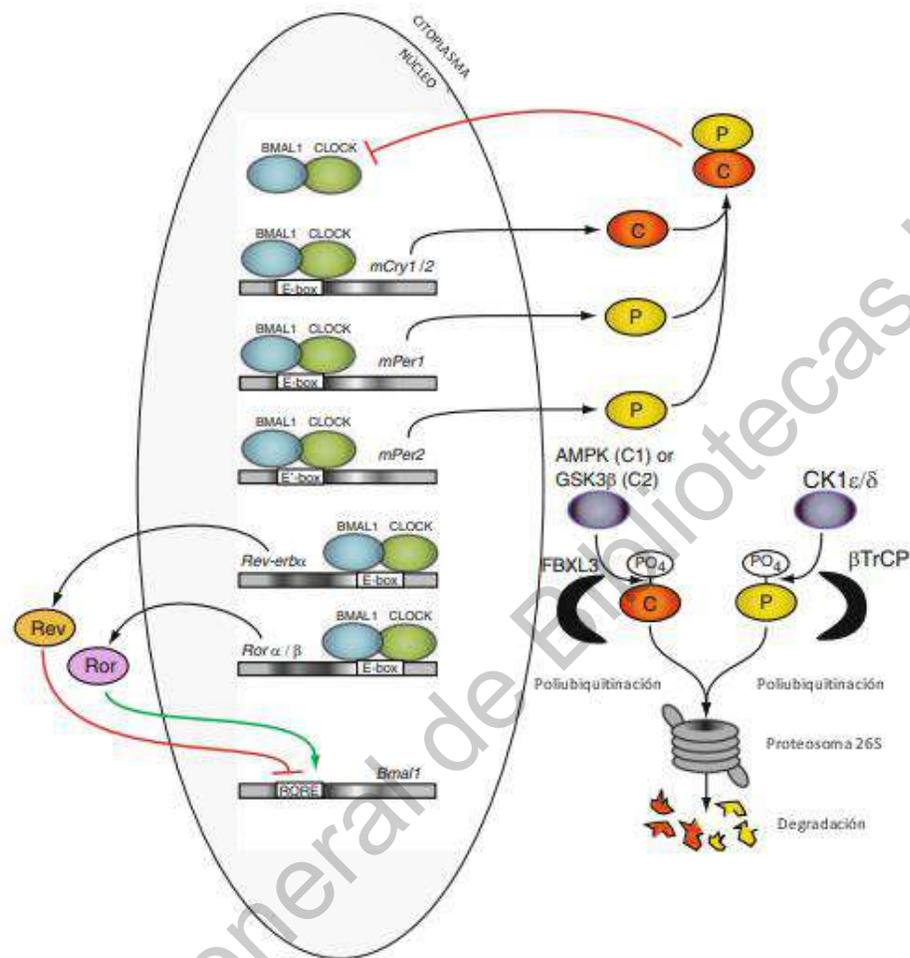


Figura 2. Esquema de la maquinaria molecular circadiana en mamíferos (Buhr y Takahashi, 2013).

2.6 La luz como sincronizador e impacto en la maquinaria molecular

La luz es uno de los zeitgebers principales para ajustar las oscilaciones moleculares dentro del núcleo supraquiasmático. La luz permite la sincronización de los ritmos circadianos con respecto al ciclo ambiental de 24 horas, a esta sincronía entre el ciclo luz/oscuridad y los ritmos circadianos se denomina fotosincronización circadiana, en donde el oscilador necesita recibir información de las células fotorreceptivas (Güler, et al. 2007). La luz es percibida a través de

los ojos mediante bastones, conos y células ganglionares retinales intrínsecamente fotosensibles (ipRGC), que contienen el fotopigmento melanopsina (Figura 3). Los ipRGC integran la información de luz entrante de dos maneras, por un lado, integra la información directamente en las ipRGC y por otro, a través de la entrada sináptica aferente de los bastones y los conos (Münch y Bromundt, 2012).

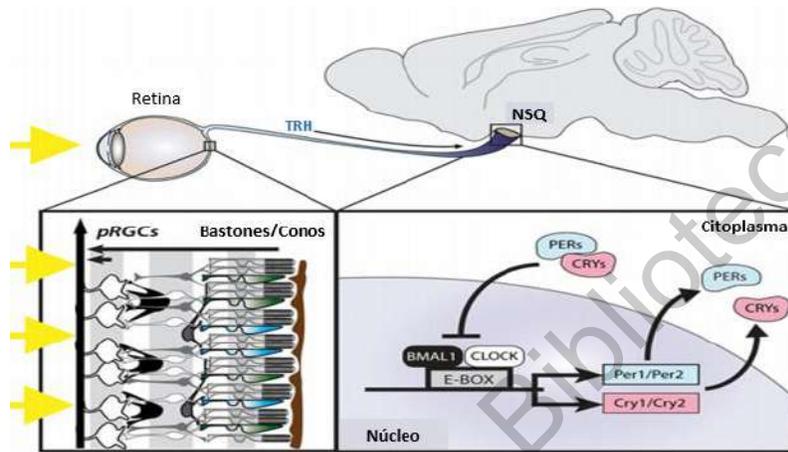


Figura 3. La luz es detectada por los foto-receptores de la retina; en particular, los ipRGC transmiten la información lumínica a través del tracto retinohipotalámico, en donde arrastra un mecanismo al reloj molecular intracelular (Fisk, et al. 2018).

La cascada de señalización luminosa que arrastra el reloj circadiano es bastante compleja, en general, los ipRGC reciben información lumínica, que se transmite al núcleo supraquiasmático directamente a través del tracto retino-hipotalámico, lo que resulta en la sincronización del NSQ mediante la secreción de factores neurohumorales (Blume, et al. 2019). Los axones de las neuronas que integran la fotorrecepción en la retina se proyectan a múltiples objetivos cerebrales, incluido el núcleo intergeniculado, el núcleo pretectal olivar, la amígdala medial, la habénula lateral y el colículo superior, lo que sugiere que las respuestas a la luz que no forman imágenes pueden involucrar diferentes proyecciones neurales (Xie, et al. 2019; Fisk, et al. 2018). Los neurotransmisores principales del tracto retinohipotalámico (TRH) son el glutamato (GLU) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP), que se liberan en

las sinapsis al NSQ en respuesta a los estímulos fóticos. Esto da como resultado aumentos en la concentración de calcio y las tasas de activación en las neuronas del NSQ (Fisk, et al. 2018). El aumento de la concentración de calcio activa las vías de señalización intracelular, convergiendo en la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP (CREB), que se transloca al núcleo, uniéndose a los elementos de respuesta de cAMP en los promotores de Per1 y Per2, aumentando su transcripción (Figura 4). Esto da como resultado que el reloj molecular del NSQ presente avances o retrasos dependiendo de la fase en que sean fotoinducidos los genes Per 1 y 2 (Fisk, et al. 2018). Por lo tanto, las neuronas del NSQ ajustan su fase circadiana de acuerdo con la entrada de los niveles de luz, y su composición espectral comunicando esta información mediante señales del sistema nervioso central y autónomo al resto del cuerpo. Estas vías de salida son recíprocas, así que, el NSQ recibe información de distintos centros cerebrales para la regulación neuro-humoral como de la serotonina y la melatonina (Blume, et al. 2019). Algunos de los efectos de la luz en la fisiología circadiana son la supresión aguda de la melatonina y el cambio de fase circadiana, así como efectos sobre la temperatura corporal, el cortisol y el electroencefalograma cortical (Blume, et al. 2019; Fisk, et al. 2018).

De manera experimental, cuando se reproducen ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, se indica el encendido de la luz como Tiempo Zeitgeber (ZT) cero, y al inicio de la oscuridad como ZT12 (Weaver, 2016). Cuando se genera un cambio en el tiempo del zeitgeber, se genera un estado de transición al nuevo horario denominado desfase de horario, el cual no es un resultado inmediato, sino gradual (Sehgal, 2004). El ajuste del reloj interno por la presencia de luz, depende del momento en que la luz se administra a lo largo del ciclo circadiano. Aunque no hay una respuesta de fase a los pulsos de iluminación durante el día, los retrasos de fase en el ritmo ocurren después de la exposición a la luz durante la noche

temprana, y los avances de fase ocurren después de los pulsos de luz durante la noche (Tahara y Shibata, 2015). El conjunto de respuestas del oscilador a la presencia de la luz se representa de manera gráfica en la Curva de Respuesta de Fase. Los períodos prolongados de exposición anormal a la luz pueden provocar una interrupción circadiana, que se ha implicado en cambios en el metabolismo, el sueño, la cognición, así como, un aumento del riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares (Fisk, et al. 2018).

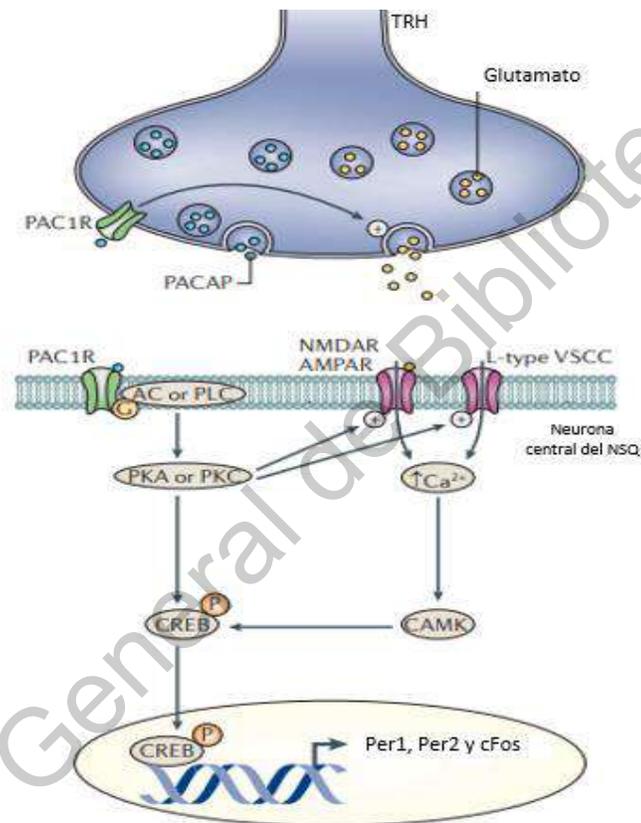


Figura 4. Luz como regulador del mecanismo de reloj molecular en las neuronas del NSQ. Las células ganglionares de la retina que expresan melanopsina codifican la luz ambiental y generan potenciales de acción que viajan por el tracto retinohipotalámico (TRH) e inervan el núcleo supraquiasmático (NSQ). El aumento de Ca^{2+} activa una serie de vías de señalización que convergen para alterar los reguladores transcripcionales y/o traducionales. PACAP, polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria; VSCC, corrientes de calcio sensibles a voltaje; PAC1R, receptor PACAP tipo 1 (PAC1R)., CREB, proteína de unión CRE al elemento responsable al AMP cíclico; AC, adenilil ciclasa; CAMK, proteína quinasa dependiente de calcio/ calmodulina; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C. (Colwell, 2011).

2.7 Alimentación como sincronizador

Los osciladores periféricos son el resto de los tejidos que presentan maquinaria molecular funcional de reloj circadiano y parecen ser altamente sensibles a los sincronizadores no fóticos, en particular se considera que la alimentación rítmica es uno de los principales sincronizadores. De esta forma, la cantidad, el momento de la comida, así como el tipo de alimento que se consume es de suma importancia ya que puede generar alteraciones no solo en los ritmos de comportamiento, sino también en las oscilaciones moleculares y metabólicas (Stubblefield y Green, 2016). El oscilador sincronizado por alimento (OSA), participa en el ciclo de alimentación-ayuno y anticipa a los animales a la presentación de la comida. Los procesos homeostáticos que regulan la ingesta de alimentos dependen de un equilibrio entre los factores orexigénicos y anorexigénicos (Challet, 2019). El sistema circadiano regula los ritmos diarios del metabolismo de los lípidos y la glucosa, en donde oscilan circadianamente, la mayoría de las hormonas principales involucradas en el equilibrio energético, entre éstas se incluye a la insulina, adiponectina, glucagón, la leptina y la grelina (Sellix, 2016). El sistema circadiano prepara al cuerpo para la alimentación durante la fase activa del día, pues se da la regulación del reloj de los ácidos biliares y los transportadores de nutrientes que optimizan la digestión durante la fase activa (Potter, et al. 2016). Además, la alimentación mejora los niveles de glucosa en sangre, y las altas concentraciones de glucosa pueden regular negativamente la expresión de las proteínas *Periodo* (PER1 y PER2) en los fibroblastos y regulan indirectamente AMPK, que controla la estabilidad de los *criptocromos* (CRY). Se conoce que la restricción alimentaria puede alterar los ciclos anabólicos/ catabólicos de los tejidos, lo que puede afectar el estado redox celular e influir aún más en el ciclo de retroalimentación circadiana. Por ejemplo, NADH y NADPH, cofactores clásicos para las reacciones redox intracelulares, pueden

promover la unión de los dímeros CLOCK/ BMAL1 al ADN, mientras que sus formas oxidadas, NAD (P)+, inhiben esta unión (Xie, et al. 2019).

2.8 Desincronización circadiana

A menudo, los términos interrupción circadiana, desalineación, desincronía circadiana, el desfase de horario social o la cronodisrupción, se usan indistintamente. La desincronización circadiana puede definirse como una perturbación relevante en el orden temporal interno del sistema circadiano, tanto a nivel fisiológico como conductual y puede ser inducida por cualquier deterioro en las vías de entrada, vías de salida y osciladores. En nuestra sociedad moderna, la desincronización ocurre como resultado de varias condiciones como el jet lag, el trabajo por turnos, la contaminación lumínica en la noche o la preferencia de actividades por la noche (Abellán, et al. 2013).

Asimismo, puede ser inducida por factores ambientales o genéticos generando grandes consecuencias para la salud, pues desencadena trastornos endocrinos, mentales, metabólicos, neuropsiquiátricos y cardiovasculares (Reiter, et al. 2013; Challet, 2019; Abellán, et al. 2013). Se ha planteado que estas consecuencias se deben en parte, a la desalineación entre el ritmo ambiental y los ritmos circadianos endógenos, así como al desacoplamiento entre los diferentes componentes del sistema circadiano (Vetter, 2018). Los factores de sincronización que son capaces de reiniciar los relojes circadianos, como la luz, las hormonas y la hora de la alimentación, se convierten en desincronizadores cuando se perciben o proporcionan en el momento equivocado del ciclo diario.

Como se mencionó anteriormente, la luz es un zeitgeber que puede regular, principalmente, el oscilador circadiano central (Narjis y Rana, 2020). La exposición a la luz en horarios inadecuados, es decir, en la fase oscura natural, provoca una alteración del sistema

circadianos, lo que, a su vez, conduce a una desregulación de la homeostasis metabólica y, finalmente, a trastornos metabólicos como resistencia a la insulina, el sobrepeso y la obesidad, pues, se ha demostrado a través de estudios en roedores, que la exposición a luz brillante constante de 24 h, los animales mostraron intolerancia a la glucosa, aumento de peso sin aumentar la ingesta de calorías, disminuyeron su gasto energético, presentan arritmia en la actividad locomotora y aplanan los ritmos de los glucocorticoides y la temperatura corporal, en comparación con ratones control con un ciclo normal de luz-oscuridad, esto, probablemente debido a la desincronía entre las neuronas de reloj y los mamíferos en condiciones de iluminación estables (Narjis y Rana, 2020; Fonken, et al. 2013). Evidencia señala que también la exposición de luz tenue durante la noche puede influir en el sistema circadiano, pues altera los genes del reloj circadiano tanto en el NSQ como en tejidos periféricos al atenuar el ritmo de expresión de genes y proteínas reloj (Fonken, et al. 2013). Se conoce típicamente que, en condiciones de oscuridad constante, las células ventrolaterales retinorreceptoras (VL) del NSQ responden a un estímulo fótico durante la noche subjetiva con un aumento en la expresión de los genes reloj de la familia Period (Per1) y los genes de expresión rápida como cFos; mientras que las células dorsomediales (DM) del NSQ muestran una oscilación circadiana en la expresión de estos genes (Golombeck, et al. 2013). Bajo sincronización de luz-oscuridad estable, las oscilaciones VL y DM-NSQ tienen una relación de fase constante (Golombeck, et al. 2013).

Por otro lado, en cuanto a la desincronización por una alimentación con horarios irregulares, se produce un desacoplamiento entre el NSQ y los osciladores periféricos y, además, el periodo necesario para resincronizar los genes del reloj en los tejidos periféricos es diferente, siendo más rápido en el hígado en comparación con otros tejidos. Se sospecha que la desincronización de los ritmos entre los tejidos y dentro de ellos es la causa de muchas

implicaciones para la salud asociadas con la noche y el horario irregular de las comidas (Collins, et al. 2020). Cuando la entrada, a través de la periférica, no coincide con el reloj central frente al tiempo de comer, da como resultado una interrupción circadiana en la que los ritmos centrales y/ o periféricos se desplazan en el tiempo de forma asincrónica o sus amplitudes se reducen (Collins, et al. 2020). Un horario de alimentación restringido a la fase de descanso, tiene potentes efectos de desincronización en los relojes periféricos, pues, a través de estudios en roedores, aquellos alimentados con pienso durante la fase de descanso ingieren más calorías y ganan más masa corporal que los controles alimentados en la fase activa. También, el ayuno impuesto a primera hora de la fase activa favorece la ganancia de masa corporal y la síntesis de lípidos de novo (Challet, 2019). Por otra parte, las ratas alimentadas con exposición a luz comen menos, pero aún pueden ganar más masa corporal que los animales alimentados por la noche o ad libitum, indicando una mayor eficiencia alimentaria en estos últimos. A través de estudios epidemiológicos se ha demostrado que las alteraciones de las comidas, como saltarse el desayuno, comer tarde en la noche y trabajar por turnos, están relacionadas con un IMC más alto y un riesgo elevado de desarrollar trastornos metabólicos (Collins, et al. 2020). Entre los efectos por desincronización causada por la alimentación, que puede variar según el horario de alimentación y la especie, se han descrito la hiperglucemia, hipoglucemia, así como reducción en niveles plasmáticos de leptina y melatonina (Reiter, et al. 2013).

2.9 Metabolismo y sistema circadiano

El metabolismo central, puede entenderse de manera simplificada, como aquellas vías que involucran abundantes nutrientes como carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, esenciales para la homeostasis energética y la síntesis macromolecular (DeBerardinis y Thompson, 2012). Sin embargo, la característica definitoria del metabolismo no son las

concentraciones de biomoléculas en sí mismas (como metabolitos, ARNm o proteínas), sino los flujos energéticos a través de reacciones, para las cuales las concentraciones solo pueden usarse como representantes indirectos de la actividad biológica (Robinson, et al. 2020).

Las vías del metabolismo central pueden separarse en dos clases: las que sintetizan moléculas simples o las que se polimerizan en macromoléculas más complejas y que requieren un aporte de energía (anabolismo) y, por otra parte, los que degradan las moléculas para liberar energía (catabolismo), en donde polímeros como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos se reducen a sus partes constituyentes: aminoácidos, nucleótidos y azúcares respectivamente (O'Connor y Adams, 2010). Las diferentes tareas metabólicas y funciones catalíticas las llevan a cabo moléculas (enzimas) que se encargan de la mayoría de transformaciones moleculares con diferentes actividades bioquímicas (De la fuente, 2015).

El metabolismo se agrega funcionalmente en múltiples niveles de especialización (transducción de señales, fosforilación oxidativa, actividad metabólica lisosómica, etc.), originando diferentes tipos de estructuras modulares específicas. Además, los procesos enzimáticos celulares exhiben otro principio fundamental de conectividad metabólica, es decir, la integración funcional. Los sistemas catalíticos organizados en distintas redes modulares parecen estar integrados; como consecuencia, las respuestas sistémicas surgen de las acciones concertadas de procesos metabólicos especializados (De la Fuente, 2015).

El sistema circadiano participa en la homeostasis de una amplia gama de procesos conductuales y fisiológicos, incluido el metabolismo de la glucosa y los lípidos, la secreción de hormonas endocrinas y salud cardiovascular. Se señala que el sistema circadiano, íntimamente ligado tanto a nivel anatómico como endocrino al sistema energético, puede interactuar con la función metabólica de un organismo en tres niveles anatómicos diferentes: regulando el comportamiento de alimentación por parte del NSQ; regulando los centros de

control metabólico dentro del hipotálamo; y la regulación de los procesos fisiológicos en tejidos metabólicamente activos (Oster, 2010). Además, se sugiere que los relojes circadianos pueden afectar los procesos metabólicos a través de cuatro rutas diferentes: 1) el control transcripcional de los genes controlados por reloj, y en última instancia, la regulación de la concentración de enzimas disponibles para las rutas metabólicas; 2) sincronización de todo el sistema del estado metabólico a través de la liberación rítmica de factores humorales; 3) la regulación neural de órganos diana; y 4) rutas que requieren interacción con el ambiente externo y por lo tanto involucran la regulación de la actividad y el comportamiento (Oster, 2010). A través de estudios genómicos y proteómicos, se ha demostrado que gran parte del transcriptoma / proteoma de un tejido dado está bajo el control del sistema circadiano (Oster, 2010). Si bien, solo un pequeño subconjunto de estos genes metabólicos oscilantes es un objetivo directo del reloj molecular, muchos codifican factores de transcripción, moduladores de la transcripción o traducción de enzimas que limitan la velocidad, que, a su vez, imparten ritmicidad a los genes y procesos metabólicos posteriores (Marcheva, et al. 2013).

2.10 Metabolismo lipídico y los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs)

Los lípidos son un grupo heterogéneo, entre estos están las grasas saturadas e insaturadas que provienen de la dieta, o bien, se sintetizan dentro de las células, representando la forma principal de almacenamiento de energía (Li, 2011). Participan en procesos biológicos como la transducción de señales, desarrollo de orgánulos y diferenciación celular, así mismo, tienen un papel importante en la composición de las membranas biológicas, hormonas esteroideas, ácidos biliares, vitaminas, entre otros (Jo, et al. 2016; Li, 2011). En general, los lípidos se pueden clasificar ampliamente en cinco categorías según sus procesos biológicos relacionados a su

estructura que son los ácidos grasos, triacilgliceroles (TAG), fosfolípidos, lípidos de esteroles y esfingolípidos (Tracey, et al. 2018). Las moléculas de lípidos deben ser procesadas a través de reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas específicas para ser aprovechadas por el cuerpo, este proceso ocurre mediante tres pasos: la digestión, la absorción y el transporte (Ogedegbe y Brown, 2001; Carpentier y Sobotka, 2008).

Los lípidos de la dieta se descomponen mediante lipólisis a través de la acción catalizada por enzimas, liberando ácidos grasos libres, moniacilglicerol, colesterol, lipofosfolípidos y vitaminas liposolubles que se transportan a la mucosa junto con ácidos biliares en donde forman micelas, las cuales se distorsionan en la región intestinal para su absorción (Griffin, 2013; Carpentier y Sobotka, 2008; Feingold y Grunfeld, 2018).

Las moléculas lipídicas diferidas a los enterocitos pueden tener diferentes destinos. Por un lado, la mayoría de estos lípidos se transportan por todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo, esto, mediante lipoproteínas que pueden seguir la vía endógena, exógena o el transporte inverso del colesterol (Feingold, 2021; Kwan, et al. 2007); o bien, pueden seguir destinos como la oxidación de ácidos grasos (oxidación α , β o δ) o la formación de gotas de lípidos citoplasmáticos (Ko, et al. 2020).

En cuanto a los ácidos grasos, componentes estructurales altamente especializados de diversos tejidos, pueden ser sintetizados dentro del hígado mediante la lipogénesis de novo, pueden provenir de la dieta, o bien, de depósitos adiposos en los tejidos periféricos (Aarsland y Wolfe, 1998). La Lipogénesis de novo (DNL) es una ruta metabólica fundamental controlada por las condiciones hormonales y nutricionales que se encarga de sintetizar ácidos grasos cuando hay un exceso de carbohidratos, siendo la glucosa el sustrato principal (Nguyen, et al. 2007; Repiso, 2015). Los ácidos grasos producidos de novo tienen múltiples destinos, pues se usan para la síntesis de triacilglicéridos (TAG), se oxidan a través de la β -oxidación (a través

de mitocondrias y/ o peroxisomas) y pueden funcionar como señales intracelulares que incluyen actuar como ligandos de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs), moduladores del receptor de hígado X (LXR), lipocinas y sustratos de palmitoilación de proteínas (Paglialunga y Dehn, 2016).

El metabolismo de los nutrientes y la homeostasis energética están estrechamente controlados por numerosos sistemas reguladores que involucran factores de transcripción específicos (Rakhshandehroo, et al. 2010). Los receptores nucleares, como los PPAR y RXR, funcionan como reguladores transcripcionales capaces de unir hormonas y detectar concentraciones de metabolitos, incluidos lípidos, oxisteroles, hemo y ácidos biliares (Mazzoccoli, et al. 2012).

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) son un grupo de receptores nucleares que participan de forma crítica en la regulación de un gran número de genes que regulan la homeostasis energética, el metabolismo de los triacilglicéridos de la glucosa y las lipoproteínas, la lipogénesis de novo, la captación de ácidos grasos, la oxidación, el almacenamiento y la exportación, la proliferación celular, la inflamación y la función del tejido vascular (Sarkisian, et al. 2017; Han, et al. 2017). Debido a que tienen una participación en muchos procesos metabólicos, los PPARs se han implicado en la patogénesis de la obesidad, el Mets, la diabetes, la aterosclerosis y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Han, et al. 2017).

Existen tres isoformas de PPAR diferentes, PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , este último dividiéndose en dos subunidades, PPAR γ 1 y PPAR γ 2 (Carvajal, et al. 2007). Los tres PPAR presentan una expresión específica de tejido y son codificados por tres genes diferentes (Stubblefield y Green, 2016). PPAR α se expresa principalmente en el hígado, corazón, tejido adiposo café y riñón; mientras que PPAR γ se expresa en altos niveles en el tejido adiposo,

variando ligeramente entre sus subunidades, pues PPAR γ 1 se expresa principalmente en tejido adiposo y colon; mientras que PPAR γ 2 se expresa principalmente en tejido adiposo y en menor proporción en el músculo (Carvajal, et al. 2007). PPAR β/δ se expresa ubicuamente en todo el cuerpo, con una expresión relativamente alta en el cerebro, el tejido adiposo y la piel (Chen y Yang, 2014; Charoensuksai y Xu, 2010).

Para la activación de la transcripción por PPAR es necesaria la unión del ligando (natural o sintético), la unión de PPAR al gen objetivo, la eliminación de co-represores y el reclutamiento de co-activadores, la remodelación de la cromatina y, finalmente, la facilitación de la transcripción génica (Charoensuksai y Xu, 2010). En general, los PPARs comparten el mismo modo de acción molecular el cual consiste en la unión al ligando, seguido de la interacción de PPAR con el receptor retinoico X (RXR) para formar el heterodímero PPAR/RXR que posteriormente se une a elementos de respuesta al proliferador de peroxisomas (PPRE) localizado en la región de genes centrales (Charoensuksai y Xu, 2010). La actividad de PPAR puede ser regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional y proteica (Charoensuksai y Xu, 2010). El heterodímero PPAR/RXR lleva a cabo el reclutamiento proteico activador y se inicia la transcripción del gen y, por otro lado, puede reprimir la transcripción de genes al unirse a las regiones promotoras y ser activados por sus ligandos; en este caso interactúan con represores proteico de los genes blanco (Carvajal, et al. 2007).

En el caso de PPAR α , la clase más importante de ligandos naturales se incluyen una variedad de ácidos grasos, así como numerosos derivados y compuestos de ácidos grasos que muestran un parecido estructural con los ácidos grasos, incluidos el acil-CoA, ácidos grasos oxidados, eicosanoides, etc. Así, PPAR α es activado y sirve como receptor para un conjunto estructuralmente diverso de compuestos, se trata del isotipo más abundante en los hepatocitos

y participa en muchos aspectos del metabolismo de los lípidos, incluida la degradación, síntesis, transporte, almacenamiento, metabolismo de las lipoproteínas y cetogénesis de los ácidos grasos durante el ayuno (Rakhshandehroo, et al. 2010; Mazzoccoli, et al. 2012; Montagner, et al. 2016). La activación de PPAR α media la inducción de la expresión de la proteína de transporte de ácidos grasos (FATP) en el hígado y el intestino. FATP controla, en parte, las concentraciones intracelulares de ácidos grasos al controlar la entrada de estos a través de la membrana celular y, por la acil-CoA sintetasa (ACS) que atrapa a los ácidos grasos dentro de las células mediante su conversión a derivados de éster (Gervois, et al. 2000).

Así mismo, PPAR α activado controla la expresión de genes implicados en la β -oxidación de los ácidos grasos peroxisomales y mitocondriales, regula la transcripción de genes implicados en la absorción y/ o metabolismo de los lípidos y la glucosa al unirse a los ácidos grasos libres endógenos (Mazzoccoli, et al. 2012). Además, PPAR α juega un papel clave en el metabolismo intracelular de ácidos grasos, al controlar genes implicados en la activación de ésteres de acil-CoA y la síntesis de cetonas en el cuerpo. Por otro lado, la isoforma α también se encarga de reducir los triacilglicéridos circulantes mediante la regulación positiva del catabolismo de los ácidos grasos en el hígado (Liu, et al. 2010). Hay evidencia que señala que PPAR α afecta la importación de ácidos grasos en las mitocondrias al regular la expresión de los genes de la carnitina palmitoil transferasa I del músculo y del hígado. A través de su efecto sobre la expresión del transportador de ácidos grasos y los genes de oxidación de ácidos grasos, los activadores de PPAR α dirigen el flujo de ácidos grasos a la vía de la β -oxidación y, por lo tanto, disminuyen el conjunto de ácidos grasos que se incorporarán a las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos (Gervois, et al. 2000). En consecuencia, PPAR α regula la homeostasis de los lípidos al controlar el flujo de ácidos grasos desde los tejidos periféricos, como el tejido adiposo

y el hígado. Es probable que PPAR α también juegue un papel en el tejido adiposo como mediador de la lipólisis inducida por leptina (Gervois, et al. 2000).

Los ligandos naturales para PPAR γ pueden ser la prostaglandina-J2 y componentes de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (oxLDL) y, por otro lado, pueden servir como ligandos sintéticos la rosiglitazona y plioglitazona (Gervois, et al. 2000; Chen y Yang, 2014).

PPAR γ es un regulador de la adipogénesis y el almacenamiento de grasa; induce la diferenciación de preadipocitos en las células grasas maduras, modula la activación de genes involucrados en la lipogénesis y el almacenamiento de triacilglicéridos, así mismo, regula la sensibilidad a la insulina, en parte, al dirigir el flujo de ácidos grasos al almacenamiento de los adipocitos (Mazzocchi, et al. 2012; Liu, et al. 2010). PPAR γ modula la homeostasis de los lípidos a través de su función en el tejido adiposo. Asimismo, la expresión génica de la proteína 2 del adipocito (Ap2), fosfoenol piruvato carboxiquinasa, Acetil coenzima A sintetasa (ACS), la proteína de transporte de ácidos grasos (FATP) y la lipoproteína lipasa (LPL), están reguladas por PPAR γ (Gervois, et al. 2000).

Para el caso de la isoforma PPAR β/δ se han identificado ligandos naturales como ácidos grasos saturados y poliinsaturados, vitamina A y proteínas de muy baja densidad (VLDL); así como ligandos sintéticos como el fármaco Endurobol (GW501516), que activan PPAR β/δ en concentraciones muy bajas (Coll, et al. 2009; NCBI, 2021).

La activación de PPAR β/δ reduce los niveles de triacilglicéridos en plasma y aumenta los niveles de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad). Así mismo, regula la disponibilidad de una proteína supresora de inflamación (BCL-6), actuando como un interruptor antiinflamatorio para controlar la inflamación y la aterogénesis provocadas por los macrófagos

(Coll, et al. 2009). En los diferentes tejidos, los PPAR β/δ pueden aumentar el transporte de ácidos grasos, la oxidación y estimular la formación de fibras musculares de contracción lenta; activan la termogénesis, puede mejorar la función contráctil y es capaz de actuar en la supresión de la producción de glucosa al regular la derivación de pentosa fosfato (Coll, et al. 2009). En general, los efectos informados de PPAR β/δ incluye la corrección de displidemia e hiperglucemia, la prevención de la obesidad inducida por la dieta, la mejora de la sensibilidad a la insulina y la modulación del cambio de tipo de fibra muscular (Liu, et al. 2010).

2.11 PPARs y el reloj circadiano

Existe un vínculo directo entre PPAR α y los relojes circadianos en donde PPAR α se identificó como un gen objetivo directo de Bmal1 y CLOCK, componentes clave de la red reguladora circadiana, a través de un mecanismo dependiente de la caja E (Chen y Yang, 2014; Charoensuksai y Xu, 2010).

PPAR α regula directamente la transcripción de Bmal1 y REV-ERB α mediante la unión a sitios PPRE en sus respectivas regiones promotoras, y de forma recíproca el heterodímero CLOCK/Bmal1 impulsa la expresión de PPAR α (Charoensuksai y Xu, 2010). Además de la regulación transcripcional, PPAR α podría modular la actividad de PER2 por medio de interacciones directas, pues PPAR α se une con PER2 y promueve la expresión de Bmal1 a través de elementos de respuesta del proliferador de peroxisomas en el promotor de Bmal1 (Tahara y Shibata, 2015). Por otro lado, mediante estudios con agonistas sintéticos, se demostró que PPAR α participa en la regulación circadiana causando avances de fases en la expresión circadiana de BMAL1, PER2 y REV-ERB α en hígado, pero sin causar alteración en la fase de genes del oscilador central, por lo tanto, se considera que PPAR α participa en la regulación circadiana independientemente del oscilador central (Chen y Yang, 2014).

Por otro lado, PPAR γ participa en la regulación transcripcional directa de Bmal1 y puede determinar la robustez de la oscilación de Bmal1 a través de REV-ERB α , siendo este también un componente del reloj central que por lo tanto será un gen objetivo de PPAR γ (Chen y Yang, 2014; Yang, et al. 2012). Se ha evidenciado que REV-ERB α realiza ciclos en el tejido adiposo y es inducido durante el proceso adipogénico después de la activación de PPAR γ (Yang, et al. 2012).

En cuanto a PPAR β/δ se sabe poco sobre la influencia del ritmo circadiano, sin embargo, hay evidencia que apoya su papel en el control metabólico y la homeostasis energética, así como su asociación entre el metabolismo y el ritmo circadiano. Por otro lado, se ha revelado una oscilación diurna dependiente de PPAR β/δ en la lipogénesis de novo en el hígado de ratón. Además, RXR α (*retinoid X receptor α*), socio de todos los PPAR, interactúa con la proteína CLOCK de una manera dependiente de ligando para inhibir la activación transcripcional dependiente de CLOCK:BMAL1 de la expresión del gen reloj en las células vasculares. Sin embargo, aún no se sabe si su función circadiana depende de los PPAR. De ser así, PPAR β/δ puede ser el socio dominante ya que se informó que las isoformas PPAR α y PPAR γ son reguladores positivos para BMAL1 (Chen y Yang, 2014).

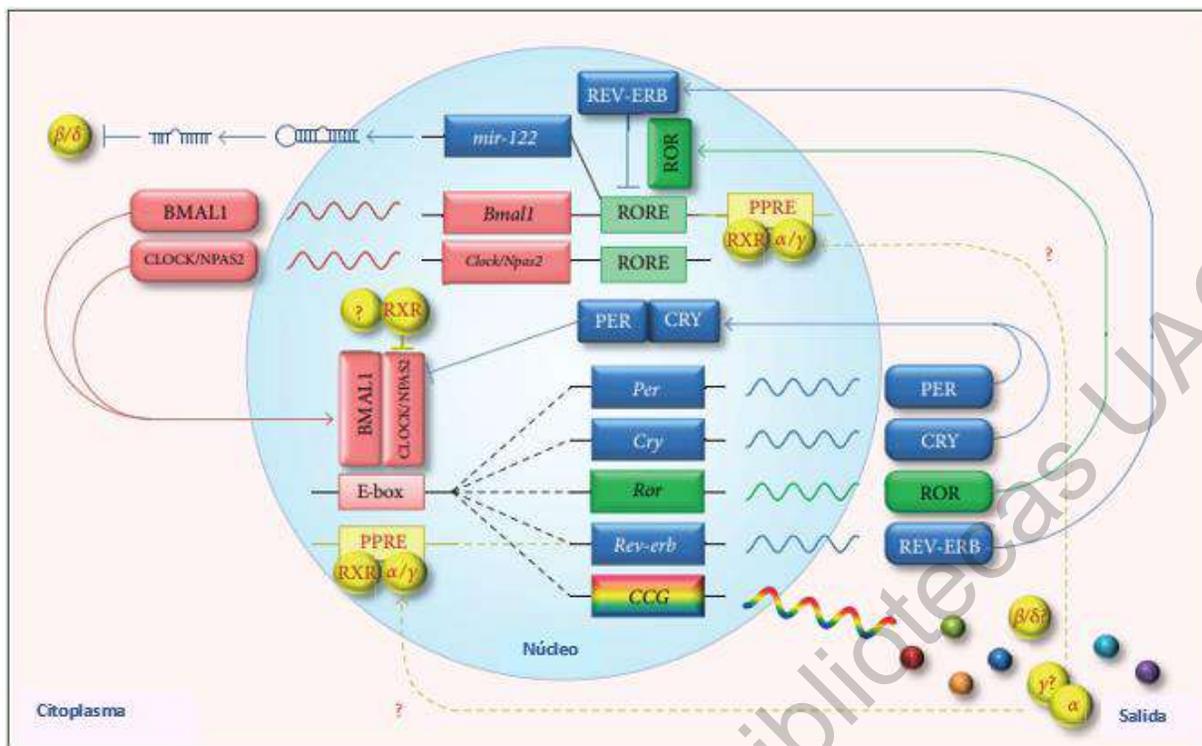


Figura 5. Mecanismo de interacción de PPARs dentro del reloj circadiano de mamíferos. Mecanismo de retroalimentación del reloj circadiano en el que los PPARs (en amarillo) están integrados al sistema. PPAR α y PPAR γ regulan la expresión de BMAL1 y REV-ERB mediante la unión a PPRE en sus promotores. PPAR α es además un gen objetivo directo de BMAL1. Por otro lado, PPAR β/δ es un objetivo miR-122, cuya transcripción es inhibida por REV-ERB. RXR, a partir de su interacción con PPAR inhibe la actividad transcripcional del complejo BMAL1: CLOCK mediante la unión con CLOCK. α : PPAR α , γ : PPAR γ , β/δ : PPAR β/δ y CCG: genes controlados por reloj (Chen y Yang, 2014).

2.12 Metabolismo de la glucosa y el reloj circadiano

La glucosa es la fuente de energía para todos los órganos del cuerpo que puede derivarse de distintas fuentes como la dietética a partir de la digestión de los carbohidratos, lípidos y proteínas de la dieta; puede ser el producto de la descomposición del glucógeno en el hígado (glucogenólisis) o la formación de glucosa en el hígado y el riñón a partir de otros compuestos de carbono (precursores) como lactato, piruvato, aminoácidos y glicerol (gluconeogénesis) (Alsahli, et al. 2017). Una vez que la glucosa entra a cuerpo, a menudo en formas isométricas como monosacáridos, disacáridos o polisacáridos (Hantzidiamantis y Lappin, 2020); viaja a

través de la sangre, y, en los tejidos que requieren energía, se descompone en una serie de reacciones bioquímicas que liberan energía en forma de ATP (Hantzidiamantis y Lappin, 2020). En las células, la glucosa puede almacenarse como glucógeno cuando hay un exceso de glucosa, puede someterse a glucólisis o puede ser liberada a la circulación a través del hígado y los riñones (Giugliano, et. al. 2008).

La regulación del glucógeno, con altas concentraciones en hígado y tejidos musculares, se controla principalmente a través de las hormonas glucorreguladoras como la insulina y la amilina, derivadas de las células β ; el glucagón, derivado de las células α del páncreas; el péptido similar a glucagón- 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), derivados de las células L del intestino; así como epinefrina y la hormona de crecimiento (Aronoff, et al. 2004).

En cuanto a la insulina y el glucagón, estos se producen en el islote pancreático de Lagerhans, y se encargan de controlar parcialmente, la glucogenólisis y la gluconeogénesis, existiendo un equilibrio entre estas hormonas dependiendo el estado metabólico del cuerpo, con insulina en concentraciones más altas durante los estados ricos en energía y glucagón durante el ayuno (Hantzidiamantis y Lappin, 2020). La insulina ejerce sus acciones al unirse a receptores específicos presentes en muchas células del cuerpo, incluidas las células grasas, hepáticas y musculares (Aronoff, et al. 2004). En ayunas, la insulina regula la concentración de glucosa plasmática principalmente restringiendo la producción de glucosa hepática. Una caída en la proporción de insulina a glucagón provoca un aumento de la producción de glucosa en el hígado, mientras que la disminución absoluta de la concentración o acción de la insulina en plasma reduce la utilización de glucosa en los tejidos periféricos (hiperglucemia posprandial) (Giugliano, et al. 2008). La insulina y el glucagón también controlan el transporte de la glucosa dentro y fuera de las células al alterar la expresión de un tipo de transportador de glucosa,

GLUT4, un tipo de transportador independiente de sodio, cuyo aumento de expresión disminuye la glucosa en sangre a través de la insulina (Hantzidiamantis y Lappin, 2020). La resistencia o deficiencia de insulina da como resultado una profunda desregulación de estos procesos y produce elevaciones en los niveles de glucosa y lípidos en ayunas y posprandiales (Saltiel y Kahn, 2001).

La homeostasis diaria de la glucosa en sangre también implica el control por el reloj hipotalámico en el NSQ, así como, de los relojes periféricos en el hígado, páncreas, músculo y tejido adiposo blanco, etc., (Kalsbeek, et al. 2014). La primera evidencia de la regulación circadiana del metabolismo de la glucosa surgió a fines de la década de 1960 y 1970, cuando varios estudios informaron variaciones diurnas en la tolerancia a la glucosa, pero una comprensión completa de la importancia del sistema circadiano para la homeostasis de la glucosa, solo se hizo evidente cuando se describió un fenotipo metabólico pronunciado en ratones mutantes Clock (Poggiogalle, et al. 2017). Estos animales no solo mostraban ritmos de alimentación gravemente alterados, sino que también eran hiperfágicos, obesos, hiperleptinémicos, hiperlipidémicos, hiperglucémicos e hiperinsulinémicos (Kalsbeek, et al. 2014). Por otro lado, una evidencia de que el NSQ está involucrado en el ritmo del metabolismo de la glucosa provino de un trabajo en el que se demostró que las lesiones del NSQ abolieron los ritmos en las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina en plasma y eliminaron la respuesta diferencial diurna y nocturna de la 2-desoxiglucosa, un inhibidor de la utilización de glucosa (Kalsbeek, et al. 2014; Jha, et al. 2015).

Dado que las necesidades energéticas del organismo fluctúan en función de la hora del día, las oscilaciones diurnas del metabolismo de la glucosa se deben en parte a los cambios diarios en la utilización de la glucosa (Jha, et al. 2015). Estas variaciones son impulsadas principalmente por cambios circadianos en las hormonas glucorreguladoras circulatorias, la

oxidación del sustrato de todo el cuerpo y la capacidad de respuesta a la insulina específica del tejido (Mancilla, et al. 2020).

El NSQ no se dirige directamente a las neuronas motoras autónomas, sino que transmiten sus señales a las ramas autónomas a través de estructuras de retransmisión hipotalámicas, siendo el núcleo paraventricular (PVN) uno de los más importantes, pues recibe señales del NSQ, las integra y las transmite a los órganos periféricos (Jha, et al. 2015). Después de recibir la información transmitida desde el NSQ, los órganos periféricos orquestan las oscilaciones diarias en la captación de glucosa, la liberación de insulina y la sensibilidad a la insulina para adaptarse al entorno luz/ oscuridad (Zhong, et al. 2019).

2.13 La curva de tolerancia a la glucosa como herramienta de estudio del metabolismo

Las pruebas de tolerancia metabólica (MTT) han sido el pilar para el diagnóstico de diabetes durante décadas, pues representan métodos de detección simples pero eficientes para diagnosticar alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina temprana (Benedé, et al. 2020).

En la investigación preclínica con roedores dentro del campo del metabolismo y la diabetes, la prueba de tolerancia a la glucosa se usa con frecuencia para evaluar animales de experimentación (Jorgensen, et al. 2017).

La prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) consiste en medir los niveles de glucosa en sangre en respuesta a una administración de glucosa. Estos experimentos permiten una investigación rápida del impacto de una intervención en la homeostasis de la glucosa (Alquier y Poitout, 2018). En general, la prueba de tolerancia a la glucosa es un enfoque global para medir qué tan bien las células del cuerpo pueden absorber glucosa después de ingerir una cantidad

determinada en azúcar (Dinger, et al. 2018). Por lo tanto, se ha convertido en una de las pruebas fisiológicas más utilizadas para caracterizar modelos de ratón con problemas metabólicos (Dinger, et al. 2018). Hoy en día, la GTT está recomendada por la OMS y debe conservarse como prueba diagnóstica para identificar a las personas con intolerancia a la glucosa. Se trata de la prueba más simple y generalmente, la primera aplicada a un animal. Proporciona una descripción fisiológica de cualquier cambio en la tolerancia a la glucosa sin determinar los mecanismos causales. Por tanto, estas pruebas se encuentran entre los métodos clave en la investigación con animales experimentales. Sin embargo, las precisiones técnicas incorrectas pueden alterar drásticamente la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados (Benedé, et al. 2020).

2.14 *Neotomodon alstoni* como modelo de estudio

Neotomodon alstoni, comúnmente conocido como el ratón de los volcanes, es una especie nocturna de la familia Sigmodontinae cuya distribución se encuentra restringida a las montañas de la Cordillera Volcánica Transversal de México (Alvares y Aceves, 1993; Mendoza, et al. 2018). De acuerdo con la Lista Roja de la IUCN, *N. alstoni* se encuentra en la categoría de "preocupación menor". Ocurre desde el centro oeste de Michoacán hacia el este hasta el centro de Veracruz, en un rango altitudinal de aproximadamente 2,500 a 4,300 m (Anaya, et al. 2019). El bosque que circunda estas áreas, varía de pino-encino en las partes más bajas a pino-oyamel, a mayor altitud (Alvares y Aceves, 1993). Se considera que es un roedor social y que su dieta es omnívora (granos e insectos), cuya vida puede alcanzar los 5 años y puede adaptarse favorablemente a las condiciones de cautiverio (Ayala, et al. 1998; Anaya, et al. 2019). En *N. alstoni*, se ha evaluado la actividad locomotora, así como la variación día-noche

de las variantes prooxidantes en diversos tejidos como el hipotálamo, el hígado y el páncreas; diferencias de regulación metabólica entre hembras y machos, etc. (Anaya, et al. 2019).

Se conoce que algunos individuos del ratón *Neotomodon alstoni* pueden desarrollar de manera espontánea la condición de obesidad después de 4 a 6 meses, si se alimenta con una dieta normocalórica utilizada para otros modelos de roedores en condiciones de cautiverio. Este cambio en el peso corporal sugiere que parte de la población es genéticamente susceptible a desarrollar obesidad. La interrupción de los ritmos circadianos también influye en la patogénesis de la obesidad, particularmente con la alteración de la ingesta y el metabolismo de los alimentos. De acuerdo con Mendoza y col. (2018) en *Neotomodon alstoni* la alteración por obesidad del reloj circadiano conduce a la desregulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos en hígado (Anaya, et al. 2019). Finalmente, esta especie ofrece oportunidades de estudio para conocer si en los ratones que no desarrollan obesidad de manera espontánea, se puede inducir con un protocolo de desincronización circadiana por fotoperiodo irregular.

3. JUSTIFICACIÓN

La desincronización circadiana puede ser inducida por factores ambientales como la exposición irregular del ciclo luz-oscuridad o la alimentación. A largo plazo, implica consecuencias negativas para la salud, pues se relaciona con el desarrollo de trastornos endocrinos, mentales, metabólicos, cardiovasculares y neuropsiquiátricos (Reiter, et al. 2013; Vetter, 2018). Por otra parte, el ratón *Neotomodon alstoni* ha servido como modelo experimental en el área de la cronobiología pues en estudios previos se ha determinado la glucemia en plasma, la tolerancia a la glucosa, la expresión de la proteína PPAR α hepática y la peroxidación de lípidos tanto en animales delgados como obesos en fotoperiodos regulares (LO: 12:12) (Anaya, et al. 2019). Sin embargo, a la fecha no se conoce si el ratón delgado *Neotomodon alstoni* presenta cambios metabólicos importantes ante un protocolo de

fotoperiodo irregular que pudiera inducir desincronización circadiana y que sirva de referencia para futuros estudios.

4. HIPÓTESIS

Si la exposición prolongada a ciclos luz-oscuridad irregulares facilita un estado de desincronización circadiana, y esta se vincula a problemas metabólicos, entonces los parámetros de tolerancia a la glucosa y la expresión relativa de PPAR α se verán negativamente afectados en ratones delgados.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar si un protocolo de fotoperiodo irregular, no utilizado previamente, sobre ratones delgados *Neotomodon alstoni* para inducir la desincronización del sistema circadiano refleja un efecto negativo a través de la comparación de parámetros metabólicos.

5.2 Objetivos particulares

Describir, mediante la comparación entre un grupo control (fotoperiodo regular LO= 12:12) y un grupo sometido a fotoperiodo irregular durante tres meses, como impacta en:

- a) La tolerancia a la glucosa, medida a través de una curva de tolerancia a la glucosa.
- b) Expresión relativa de la proteína PPAR α hepática, asociada al metabolismo lipídico.

Y determinar si el protocolo de fotoperiodo irregular utilizado en este trabajo funciona como mecanismo para inducir la desincronización circadiana.

6. MÉTODOS

6.1 Animales de laboratorio:

Los ratones *N. alstoni* fueron obtenidos de la colonia que se maneja en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se usaron 8 ratones machos con un peso de 43 a 48 g. Los ratones fueron aclimatados en una habitación con alimento ad libitum, temperatura (23 ± 3 °C) y fotoperiodo controlado (LO= 12: 12). Los protocolos en el manejo de los animales empleados en este estudio fueron autorizados por la comisión de ética académica y responsabilidad científica de la facultad de ciencias, UNAM (anexo 1).

6.2 Protocolo de desincronización

Posterior a las tres semanas de aclimatación, ocho ratones fueron introducidos a un protocolo de desincronización dentro de una cámara de ambiente controlado (ADAPTIS 1000) que contenía un sistema de monitoreo de actividad locomotriz mediante sensores infrarrojos. El sistema estuvo activo las 24 horas del día durante los días de estudio (ver Figura 6). En este trabajo no se consideró el análisis de los patrones de actividad durante la exposición al fotoperiodo irregular. El protocolo de desincronización consistió en tres ciclos LO 12:14 (retrasos de horario) seguidos de luz constante por 30 horas y finalmente tres ciclos LO 12:10 (avances de horario) (Ver Figura 7), durante aproximadamente tres meses.

El mantenimiento de los animales dentro de la cámara fue similar al ya indicado. Se realizó una vez a la semana, procurando que fuera a las horas en que se encontrara prendida la luz, de acuerdo al protocolo de luz-oscuridad.

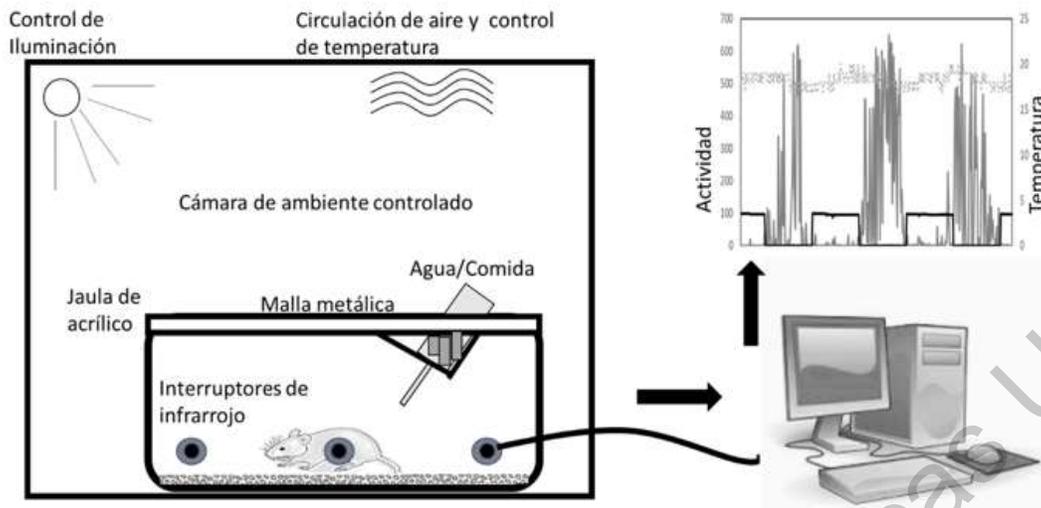


Figura 6. Representación gráfica del sistema de ambiente controlado (ADAPTIS 1000) en el que se mantuvieron a los ratones y cuyos registros de actividad locomotriz, iluminación y temperatura para cada ratón fueron capturados por un sistema de cómputo ACTIBIO y posteriormente analizados en el programa ACTIVIEW y en el programa Excel.



Figura 7. Actograma de doble trazado representativo del Protocolo de desincronización aplicado a los ratones *N. alstoni*, en donde de manera vertical se indican los días de la semana

y de manera horizontal la hora del día. Las franjas amarillas representan la iluminación. El protocolo consiste en tres días seguidos de retraso de fotoperiodo, un día de luz constante y dos días de jet lag con avances consecutivos para luego repetirse la siguiente semana hasta el fin del experimento.

6.3 Curva de tolerancia a la glucosa

Los ratones se mantuvieron en ayuno durante 5 horas y la prueba se realizó al medio día (11:00-12:00), durante la fase de iluminación en ambos grupos evaluados. El proceso consistió en realizar una dilución de glucosa al 50%, de la cual se inyectaron vía intraperitoneal (IP) 200 microlitros de solución, con ayuda de una jeringa de 10 ml.

Previo a la inyección se colectó sangre de la vena caudal para medir la concentración basal de glucosa. Pasados los 30 minutos de que se inyectó la dilución, se limpió la herida y se drenó suficiente sangre para medir nuevamente la glucosa con ayuda de un glucómetro (ACCUCHECK). El proceso se realizó 5 veces, tomando muestra cada 30 minutos en todos los casos. Los datos se fueron recopilando en una libreta para posteriormente, con ayuda del programa Excel, obtener la curva de tolerancia a la glucosa de cada ratón.

6.4 Sacrificio y obtención de órganos

Al término del registro, los ratones *N. alstoni* se sacrificaron por decapitación a las 08:00 de la mañana. El tejido hepático extraído se mantuvo en congelación (-80°C) hasta su posterior análisis.

6.5 Procesamiento del hígado

Se obtuvieron los hígados de 4 ratones en control y 4 ratones sometidos al protocolo de desincronización, estos se sacaron de congelación para el estudio y se mantuvieron en una

gradilla con base congelada y fueron pesados para poder determinar el volumen de la solución RIPA (buffer RIPA con una tableta de inhibición de enzimas añadida). Se prepararon tubos eppendorf etiquetados previamente con el nombre del órgano, así como el ratón al que pertenecía. Cada sección de hígado se transportó a un tubo de cristal al que se le agregó su determinada cantidad de RIPA y era mezclado con un pistilo homogenizador con ayuda de un taladro hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, la mezcla se vertió en tubos eppendorf etiquetados. Una vez que se tenían todos los homogenados, se llevaron a centrifugar a 120 rpm durante 20 minutos.

Las alícuotas libres de grasas se pasaron a otros tubos eppendorf previamente etiquetados con ayuda de una micropipeta 200 μ l, los cuales debían mantenerse en una gradilla con base congelada. Finalmente, las alícuotas se llevaron a congelación (-80°C) hasta su posterior uso.

6.6 Cuantificación de concentración de proteínas

Para este proceso se requirió diluir el reactivo Bradford (BIORAD) con agua destilada a una dilución 1/5. Por otra parte, se preparó la dosis de curva estándar, diluyendo 1/10 el stock de albúmina de suero de bovino (BSA) de 10 mg/ml con agua destilada quedando una concentración de BSA de 1 mg/ml. Posteriormente se realizó una dilución 1/5 de BSA con agua destilada, quedando una concentración de 200 μ g/ml.

Para la curva estándar se trabajó por duplicado en placas Elisa de 96 pozos de fondo plano estériles, en las cuales se depositaron los volúmenes de 0, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5 μ l de la dilución de BSA y posteriormente se agregaron los 200 μ l de la dilución del reactivo Bradford. La placa se llevó a analizar al espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific) para la obtención de los valores de la curva estándar. Se consideró correcta al obtener un valor igual o mayor a 0.98. En la misma placa se depositó por duplicado la preparación de 2 μ l de las

alícuotas del tejido de interés y agua destilada, se agregaron 200 μ l del reactivo Bradford para cada uno. Mediante esos valores, se podría obtener el volumen necesario de alícuota de tejido necesario para 80 μ g de proteína.

6.7 Western Blot

Se mezclaron las cantidades de proteína (80 μ g) estimadas con el buffer Laemmli (Bio-Rad) 2X (1:1) y se incubaron durante 3 a 5 minutos en agua hirviendo (95-100 °C) para desnaturalizar las proteínas. Los geles de poliacrilamida al 10% se colocaron en la cámara de electroforesis a la que se le agregó el buffer de corrida hasta el borde indicado de acuerdo a la cantidad de geles. En ambos extremos de cada gel se depositaron 2 μ l de marcador de peso molecular (BIO-RAD).

Las mezclas del volumen de proteína estimada con el buffer Laemmli se depositaron en los pozos evitando sobrepasar los 25 μ l. Las proteínas se separaron durante 2 horas a 100- V. Posteriormente los geles se sometieron a un electroblot (transferencia en semihúmedo) sobre una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante el buffer de transferencia durante 35 minutos a 23 V. A continuación, las membranas se colocaron en un recipiente de plástico y se bloquearon durante dos horas en leche descremada (*Sveltis light* en polvo) al 5% con TBST (TBS Tween). Al terminar el bloqueo, cada membrana se separó con ayuda de un bisturí, buscando separar las distintas bandas de acuerdo con el peso molecular del anticuerpo utilizado y con ayuda como guía del control de carga constitutivo GADPH. Los cortes de las membranas se incubaron en un recipiente con distintos compartimentos a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo: el anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH, dilución 1:5000, ~37 kDa; Genetex); y un anticuerpo policlonal de cabra: el receptor activado por el proliferador anti-peroxisoma α (PPAR α , dilución 1:1000, ~55 kDa, Santa Cruz). Al día

siguiente, los anticuerpos policlonales se retiraron y las membranas se lavaron con TBST; se incubaron durante 2 horas en agitación suave con el anticuerpo secundario en TBST: burro anti conejo IgG-AP (dilución 1:5000) y anticuerpo secundario policlonal de burro a cabra igG-H & LAP (dilución 1:5000). Las bandas se visualizaron usando el kit de sustrato conjugado AP (Bio-Rad), preparando el buffer revelador con el buffer Tris con Ph 9.5 al que se le agregó la solución A y la solución B del kit, el cual se mezcló suavemente, se depositó sobre las membranas y se realizó la reacción protegiendo las membranas de la luz y en agitación suave. Las transferencias se digitalizaron mediante escaneo y se normalizaron a la señal GADPH, utilizada como control de carga.

6.8 Escaneo de membranas

Cuando las bandas se visualizaron en las membranas, la reacción se detuvo retirando el conjugado AP y las membranas pasaron por lavados con agua destilada. Antes de que se secaran, se colocaron en el escáner con ayuda de unas pinzas, procurando una posición derecha y conociendo el orden que llevaba cada banda para saber qué muestra de hígado era cada una. Se determinó en dónde se debían marcar las bandas de acuerdo con el peso molecular de cada proteína. Con el programa que controla el escáner, se indicó escanear la membrana y se buscó hacer un límite únicamente sobre la membrana. La imagen se guardó con los datos del anticuerpo utilizado.

La imagen de cada banda se analizó en el programa ImageJ (NIH) y se hizo un recuadro que abarcara las franjas marcadas de interés de manera horizontal. Posteriormente se seleccionan los comandos que darían como resultado una gráfica, la cual indicó qué tanto se expresó la proteína de interés en cada tejido evaluado. Se seleccionó la tabla de datos de la respectiva

gráfica y se guardaron en un archivo de Excel, indicando a qué anticuerpo, tejido y ratón pertenecían esos datos para posteriormente estimar los valores densitométricos.

6.9 Análisis de datos

Curva de tolerancia a la glucosa

Las comparaciones de curvas de tolerancia a la glucosa fueron hechas mediante la obtención del área bajo la curva para cada sujeto, obtenidas y comparadas (prueba no paramétrica de U de Mann Whitney) mediante el uso del software GraphPrism 7.0.

Expresión relativa de PPAR α en hígado

Se compararon los resultados densitométricos entre grupos, determinados mediante el software ImageJ y manipulados mediante el programa excel, de la expresión relativa de PPAR α comparada con GADPH como control de carga. La comparación se realizó mediante una prueba no paramétrica U de Mann Whitney, con ayuda del paquete de cómputo Graph Prism 7.0.

7. RESULTADOS

7.1 Tolerancia a la Glucosa

Después de 5 horas de ayuno, los ratones *N. alstoni* del grupo control (LO 12:12) y del grupo experimental, en fase inicial, se usaron para medir la glucosa basal, luego fueron inyectados IP con la solución de glucosa al 50% y se tomó muestra de sangre en tiras reactivas para determinar la concentración de glucosa en sangre (mg/ dl) a través del glucómetro. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento a ratones machos delgados que fueron previamente sometidos a un protocolo de desincronización durante 3 meses (n=6).

El peso de los ratones se tomó antes de someterlos al ayuno en ambos grupos experimentales, encontrándose un aumento no significativo en el grupo con desincronización circadiana (**Figura 8**).

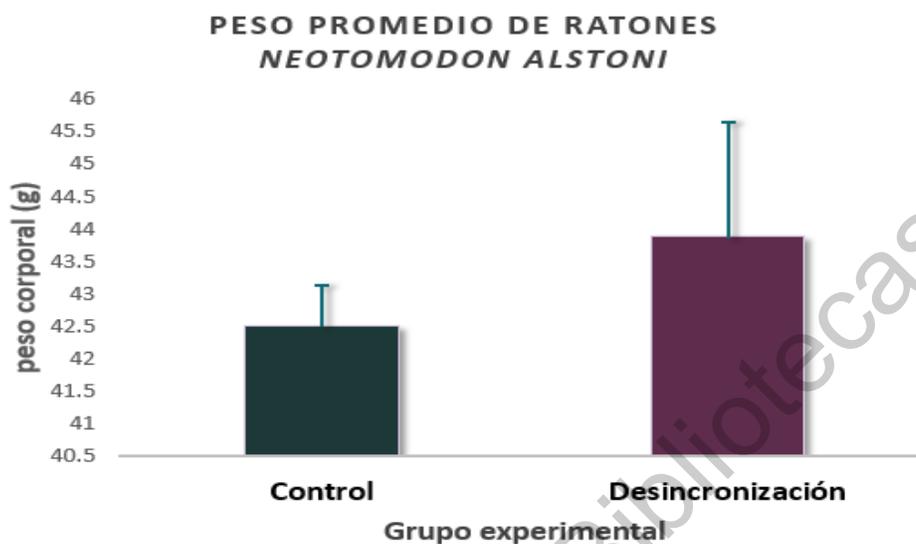


Figura 8. Comparación gráfica del peso corporal promedio entre el grupo de ratones control (42.5 ± 0.615 g) y el grupo con desincronización circadiana (43.8 ± 1.77 g). No existen diferencias significativas.

Con los datos de muestreo de sangre (0, 30, 60, 90 y 120 minutos) obtenidos de la concentración de glucosa en sangre (mg/ dl) se realizó una curva de tolerancia a la glucosa (**Figura 9**), obteniendo una comparación entre el grupo control y el de desincronización. Se demostró que la concentración de glucosa en sangre fue similar al inicio del muestreo, antes de la administración de glucosa intraperitoneal. Posterior a la administración de glucosa, en las muestras 2 y 3, la concentración de glucosa en sangre fue más alta en el grupo control con respecto al de desincronización, sin embargo, en el tercer muestreo ya se observa una disminución de la concentración de glucosa en el grupo control (línea azul, **Figura 9**), mientras que, en el grupo con un fotoperiodo irregular, la glucosa en sangre sigue en aumento con respecto al punto anterior (línea violeta, **Figura 9**). En el cuarto muestreo, la concentración de

glucosa del grupo control ya es menor que la que grupo de desincronización, en cuyo punto también empieza a descender. En el quinto y último muestreo (120 minutos), la concentración de glucosa sigue siendo mínimamente mayor en el grupo de desincronización que en el control, pero ambos acercándose a los valores de glucosa basal en sangre.

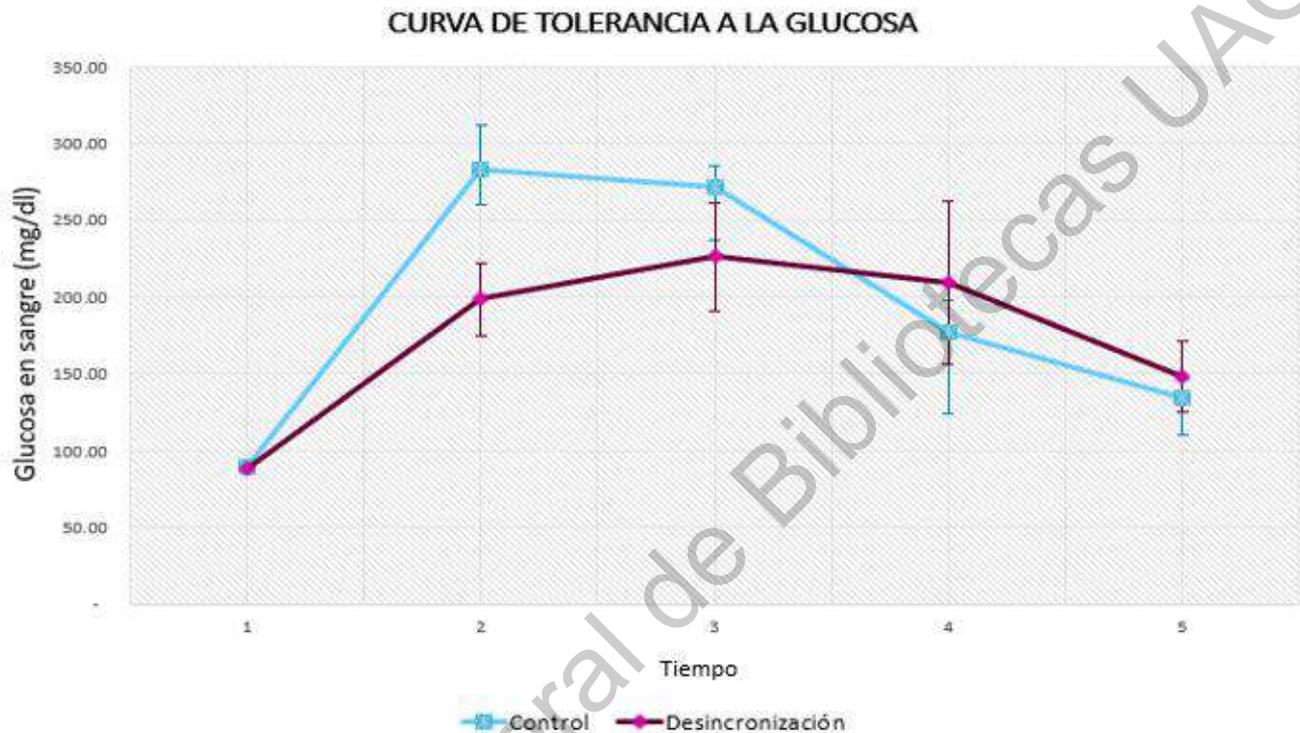


Figura 9. Curva de tolerancia a la glucosa representando la respuesta del grupo control (azul) y la del grupo con desincronización circadiana (Violeta). No existen diferencias significativas.

Mediante la curva de tolerancia a la glucosa, se realizó un análisis utilizando el programa *GraphPad Prism* para determinar el valor total del área bajo la curva (**Cuadro 2**) y posteriormente se obtuvieron los valores promedio para cada grupo experimental (**Cuadro 3**). Además, se realizó una comparación gráfica entre los valores promedios de cada grupo (**Figura 10**) y mediante una prueba U de Mann Whitney (*GraphPad Prism*) se determinó que no había diferencias significativas entre los grupos experimentales (**Cuadro 6**).

		Valores del área bajo la curva							
Grupo		1	2	3	4	5	6	7	8
Control	Área total	22871	27404	16253	22689	19230	24603	23285	23648
	Área total el pico	22871	27404	16253	22689	19230	24603	23285	23648
Desincronización			1	2	3	4	5	6	
	Área total		11469	22974	14180	16695	17967	29205	
	Área total del pico		11469	22974	14180	16695	17967	29205	

Cuadro 1. Datos obtenidos del programa *GrpPdh Prism* del área total bajo la curva para los datos del grupo control (n= 8) y con desincronización circadiana (n= 6).

	Promedio AUC	Error Estándar
Control	22497.88	1209.604
Desincronización	18748.33	2629.878

Cuadro 2. Valores promedio del área bajo la curva del grupo control y el grupo con desincronización, así como error estándar respectivamente.

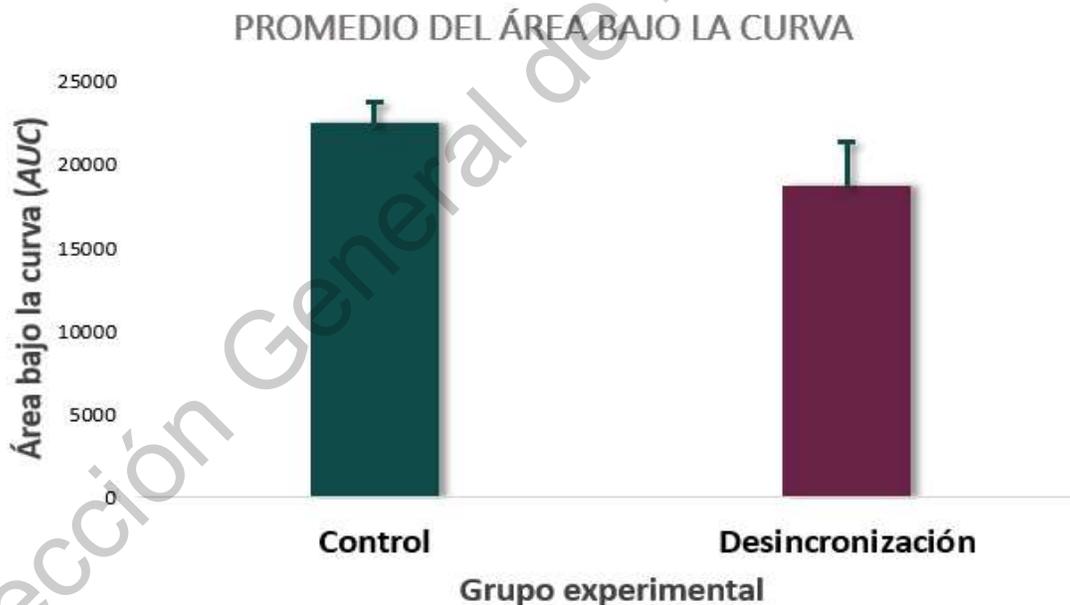


Figura 10. Comparación gráfica de los valores promedio del área bajo la curva en los grupos experimentales, control (22497.8 ± 1209.6) y con desincronización (18748.3 ± 2629.8). No se encontraron diferencias significativas.

Prueba U Mann Whitney	
Valor de P	0.2284
Valor de P exacto o aproximado	Exacto
¿Diferencia significativa (P < 0.05)?	No
¿Valor de P unilateral o bilateral?	Bilateral
Suma de los rangos en columna A, B	70 , 35
U Mann-Whitney	14
Diferencias entre medianas	
Mediana de columna A	23078, n=8
Mediana de columna B	17331, n=6
Diferencia: Actual	-5747
Diferencia: Hodges-Lehmann	-4977

Cuadro 3. Prueba U de Mann Whitney para la comparación de los valores promedio del área bajo la curva para el grupo control y con desincronización. No hubo diferencias significativas.

7.2 Expresión relativa de PPAR α hepático

De muestras de hígado de los dos grupos experimentales (control y fotoperiodo irregular) de ratones *Neotomodon alstoni* delgados, se realizó la técnica de Western Blot para la expresión de la proteína PPAR α . A partir de las membranas generadas, se realizó el análisis en el programa ImageJ para determinar la densidad semi-cuatitativa tanto de la proteína PPAR α como de la proteína constitutiva GADPH para posteriormente obtener el valor densitométrico de la proteína PPAR α en hígado (**Cuadro 7**).

Estado	Muestra	PPAR α	GADPH	Resultado
		U. A. Densitometría	U. A. Densitometría	
Control	1	47063.53	41150.702	1.1437
	2	51650.116	45756.945	1.1288
	3	63816.116	34243.995	1.8636
	4	60798.723	54329.652	1.1191

	5	53002.359	60000.409	0.8834
Desincronización	6	42393.238	55190.631	0.7681
	7	47983.844	53209.309	0.9018
	8	45799.48	52459.53	0.8730

Cuadro 4. Datos de la densidad semi-cuatitativa de la proteína objetivo PPAR α y la proteína constitutiva GADPH de las muestras hepáticas de los ratones control y los experimentales, en donde el resultado representa los valores densitométricos de la proteína PPAR α .

Mediante los resultados densitométricos, se determinó la expresión relativa media de PPAR α en el tejido hepático y se observa que la expresión es mayor en el grupo control con respecto al grupo con desincronización (**Figura 11**)

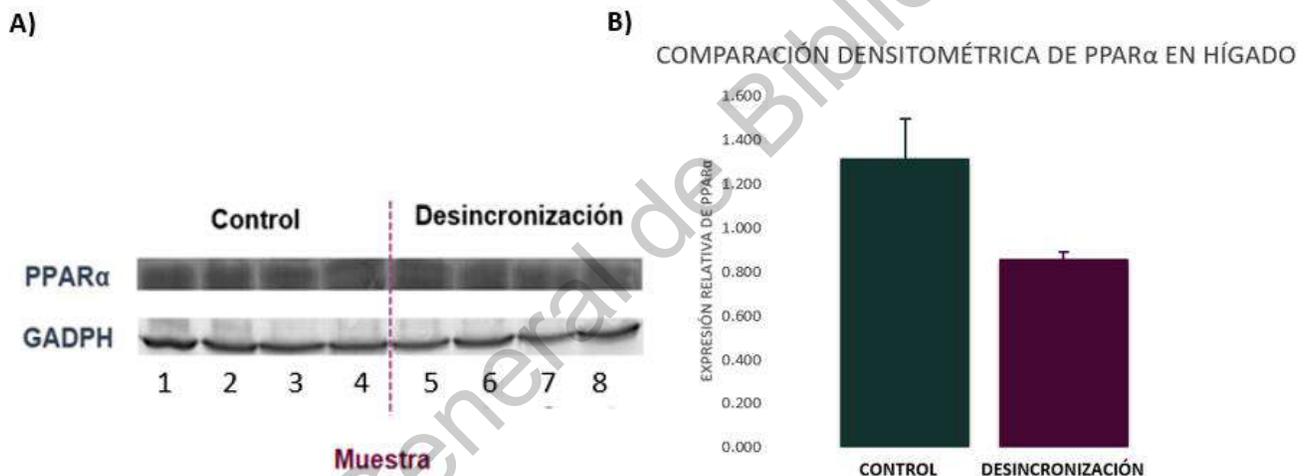


Figura 11. A) Inmunoblots representativos en donde se muestra la señal generada de PPAR α (50 kDa) y GADPH (37 kDa) en el hígado de los ratones control y los ratones con desincronización. **B)** Comparación de la expresión relativa media de la proteína PPAR α en hígado del grupo control (1.314 \pm 0.18) y del grupo con desincronización (0.856 \pm 0.03).

Mediante la prueba U de Mann-Whitney, realizada en el software *GraphPad Prism* (**Cuadro 8**), se comparó la expresión relativa de la proteína PPAR α entre los dos grupos evaluados, obteniendo un valor de P= 0.0286. Ya que se consideró a P < 0.05 como estadísticamente significativo, se determinó entonces que, si hubo diferencias significativas entre los grupos

control y el grupo de desincronización en cuanto a la expresión relativa de la proteína PPAR α en hígado.

Prueba U Mann Whitney	
Valor de P	0.0286
Valor de P exacto o aproximado	Exacto
¿Diferencia significativa (P < 0.05)?	Sí
¿Valor de P unilateral o bilateral?	Bilateral
Suma de los rangos en columna A, B	10 , 26
U Mann-Whitney	0
Diferencias entre medianas	
Mediana de columna A	0.878, n=4
Mediana de columna B	1.137, n=4
Diferencia: Actual	0.2585
Diferencia: Hodges-Lehmann	0.266

Cuadro 5. Comparación de la expresión de PPAR α de los dos grupos experimentales mediante la prueba U de Mann Whitney obtenidos mediante el software *GraphPad Prism*. Se presentaron diferencias significativas.

8. DISCUSIÓN

8.1 Tolerancia a la glucosa

Con base en los resultados del área bajo la curva de los datos de glucosa en sangre entre los dos grupos evaluados, se demostró, mediante la prueba U de Mann Whitney, que no existen diferencias significativas (**P=0.2284**), pues aunque el comportamiento en los puntos de muestreo, como se muestran en la **Figura 9** de la curva de tolerancia a la glucosa mostró diferencias, ambos grupos evaluados después de 2 horas de la administración de glucosa, llegan a regular la glucosa en sangre hasta el punto de estar cerca de volver a la concentración de glucosa basal, mostrando una regulación glucémica similar y por tanto, sin posible asociación con el desarrollo de problemas metabólicos, pues mantener concentraciones altas de glucosa después de 2 horas está asociado a desarrollar enfermedades metabólicas

(Nakanishi, et al. 2013). Siendo así, el protocolo de fotoperiodo irregular no habría causado una alteración en la regulación metabólica glucémica, al menos después de tres meses en que se mantuvieron a los animales bajo el fotoperiodo.

Se considera que la excursión total de glucosa, determinada por el AUC, puede brindar más información sobre la tolerancia a la glucosa, pues se trata de un índice utilizado para calcular el índice glucémico (respuesta glucémica) (Kazuhiko, et al. 2016). En la **Figura 10** se puede observar que el AUC del grupo con fotoperiodo irregular, fue un tanto mayor que el del grupo control, no de manera significativa, sin embargo, podría indicar que la glucosa en sangre se retira mínimamente más rápido en el grupo de fotoperiodo irregular, y, siendo una respuesta contraria a lo que se esperaba, se considera que pudieron influir factores fisiológicos y ambientales, como el estrés, pues se ha demostrado que el aumento de las catecolaminas y los niveles de cortisol inducidos por el estrés, mejoran la producción de glucosa en el hígado, lo que afectaría la evaluación de la tolerancia a la glucosa (Wilcox, 2005). Al ser posible, podría afectar la interpretación de los resultados y se sugiere realizar la prueba manipulando el menor tiempo posible a los animales para reducir variables como el estrés.

La insulina mantiene los niveles normales de glucosa en sangre al provocar la disminución de esta última. Sin embargo, para conocer el impacto que pudiera tener la insulina, se debe hacer una distinción entre la acción de la insulina y la secreción de la insulina. A través de un examen del curso temporal de la insulina plasmática, es posible revelar que la tolerancia a la glucosa sea por disfunción celular o por la acción alterada de la insulina, pues es posible que una tolerancia a la glucosa mejorada, sea el resultado de una secreción exagerada o de una hipersensibilidad a la acción de la insulina (Petersen y Shulman, 2018). Por lo que, para determinar si la regulación de la reducción de glucosa en sangre del grupo con fotoperiodo irregular se debe a una regulación normal, como se esperaría del grupo control, o es más bien

causada por una alteración en la actividad de la insulina es necesario emplear la técnica correspondiente sobre la respuesta de la insulina.

El NSQ presenta proyecciones mutisinápticas a muchos órganos relacionados con el metabolismo de la glucosa, como el hígado, el tejido adiposo y el páncreas (Jingyi y Scheer, 2016), siendo así, una prueba de tolerancia a la glucosa no es suficiente para determinar si existen efectos sobre el oscilador central y los periféricos, por lo tanto, sería adecuado integrar estudios específicos de tejido, como análisis moleculares de genes implicados en la vía metabólica celular de la glucosa.

8.2 Expresión relativa de PPAR α hepático

De acuerdo a los valores obtenidos a partir de los datos densitométricos entre la proteína PPAR α y GADPH, para determinar el valor de expresión relativa de PPAR α en el tejido hepático de los grupos experimentales *N. alstoni* control y sometido a fotoperiodo irregular, se demostró, a través de la prueba U de Mann Whitney, que hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales (**P= 0.0286**), encontrándose una expresión reducida de la proteína PPAR α en el grupo sometido a fotoperiodo irregular.

Puesto que la expresión de PPAR α está impulsada por el heterodímero CLOCK/Bmal1 (Chen y Yang, 2014) y, además, regula la transcripción de elementos de la maquinaria molecular como Bmal1 y REV-ERB α (Charoensuksai y Xu, 2010), es posible, en parte, que la reducción de su expresión en ratones con fotoperiodo irregular se haya visto influenciada por la alteración del heterodímero CLOCK/Bmal1, pues la transcripción de Bmal1 estaría regulada por PPAR α , sin embargo, sería necesario emplear pruebas moleculares sobre esos elementos de la maquinaria molecular para hacer una mejor correlación.

Por otra parte, ya que la expresión de PPAR α en hígado está reducida en el grupo de fotoperiodo irregular, tendría un impacto sobre la regulación positiva de numerosos genes involucrados en la captación y activación de ácidos grasos, la oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos (en roedores), síntesis de cuerpos cetónicos, elongación y desaturación de ácidos grasos y síntesis de apolipoproteínas (Patsouris, et al. 2006). Además, PPAR α se encarga de controlar el nivel de expresión de proteínas como la acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga, la *acil-CoA oxidasa*, la *hidrociacil-CoA hidrata/deshidrogenasa*, la *cetoacil-CoA tiolasa*, la *acil-CoA hidrogenasa*, la *hidroximetilglutaril-CoA sintetasa* (enzima limitante para la síntesis de colesterol), la apolipoproteína AII (necesaria para la formación de lipoproteínas de alta densidad o HDL) y citocromos P450 (que hidroxila ácidos grasos) (Uauy, et al. 2000). De esta manera, hay evidencia que pudiera sustentar que en ratones sometidos al fotoperiodo irregular y que presentaron una expresión significativamente reducida de la proteína PPAR α en hígado, conduciría a una influencia negativa sobre el óptimo funcionamiento metabólico, a través de su influencia sobre genes y proteínas involucradas ya sea de manera directa o indirecta, sobre los distintos procesos de regulación metabólica hepática.

Por una parte, PPAR α controla los niveles de expresión génica de enzimas como ACOX1 (*acil-CoA oxidasa*) y EHHADH (*enzima bifuncional peroxisomal L*) así como de MCAD (*acil coenzima A deshidrogenasa de cadena media*), LCAD (*acil coenzima A deshidrogenasa de cadena larga*) Y VLCAD (*acil coenzima A deshidrogenasa de cadena muy larga*), regulando de manera crítica la regulación de la oxidación peroxisomal y la oxidación β -mitocondrial, respectivamente (Pawlak, et al. 2015). De esta manera, ya que los ratones de fotoperiodo irregular mostraron una afección en expresión normal de PPAR α , ambas vías de oxidación de ácidos grasos se verían alteradas por una influencia directa sobre la expresión génica de

enzimas clave en la regulación de la oxidación de ácidos grasos y esta alteración se caracteriza por la acumulación de lípidos en el hígado, así como incapacidad para aumentar la síntesis de cuerpos cetónicos (Pawlak, et al. 2015).

Al estar involucrado en la síntesis de cuerpos cetónicos, como se mencionó anteriormente. La activación de PPAR α , aumenta la expresión mitocondrial de una enzima limitante de la cetogénesis, la HMGCS (*hidroximetil-glutaril-CoA sintasa*), que cataliza la condensación de acetil-CoA y acetoacetil-CoA para generar HMG-CoA (*hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A*) y CoA. Por lo tanto, al haber una atenuación inducida por un PPAR α reducido sobre la maquinaria molecular de la síntesis de cuerpos cetónicos en ratones con desincronización, podría tener un papel en la disminución de fuente de energía para tejidos extrahepáticos como el cerebro, así como un papel en enfermedades metabólicas, prevención del envejecimiento y del cáncer (Wang, et al. 2020).

Hay varias líneas de evidencia que demuestran un papel importante de PPAR α en el control de la homeostasis de la glucosa (Peeters y Baes, 2010). En roedores, PPAR α también está involucrado en la producción de glucosa hepática pues controla, ya sea de manera directa o indirecta, las vías lipogénicas en el hígado. Entre los genes relacionados de PPAR α con la lipogénesis se incluyen la *ácido graso sintasa* (FAS), *acetil-Coenzima A carboxilasa* (ACACA), el *factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroles* (SREBP1 y SREBP2), etc. (Pawlak, et al. 2015; Duval, et al. 2007). En otros estudios, ratones nulos de PPAR α presentan una marcada hipoglucemia en ayunas (Peeters y Baes, 2010), sin embargo, en pruebas realizadas por Xu, et al. 2002, indicaron que no se vieron afectadas ni la prueba de tolerancia a la insulina ni la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal, por lo que la hipoglucemia en ayunas se asocia a una mayor estimulación, mediada por la insulina de la utilización de glucosa en todo el cuerpo y la inhibición de glucosa hepática (Patsouris, et al. 2006). Lo anterior

se podría relacionar con los resultados obtenidos de la tolerancia a la glucosa, pues de manera similar, no se vio afectada la prueba de tolerancia a la glucosa en los ratones bajo fotoperiodo irregular y, además, hubo una menor excursión de glucosa (no significativa) con respecto al grupo control, sugiriendo una posible mayor estimulación por la insulina sobre la utilización de la glucosa.

Al haber una reducción en la expresión de PPAR α , tendría como consecuencia un impacto sobre elementos esenciales para que ocurra la gluconeogénesis como el ATP, NADH y Acetil-CoA, que se puede generar a partir de la oxidación de ácidos grasos (vía regulada por PPAR α), por lo tanto, podría tener un papel sobre la síntesis estable de glucosa hepática durante el ayuno y no proporcionaría la energía adecuada para el organismo.

Se conoce que las vías activadas por PPAR α favorecen el transporte de los lípidos a los tejidos (Abranches, et al 2011). En el caso de los ratones, hay evidencia de que PPAR α tiene un impacto en la secreción de TAG hepáticos, pues la delección de esta isoforma de PPAR está asociada con un aumento significativo de la producción de VLDL-TG (lipoproteínas de muy baja densidad) en hígado, así como con reservas hepáticas elevadas de TAG, volviéndose aún más pronunciado después del ayuno prolongado (Kersten, 2008). Así, una alta concentración de triacilglicéridos hepáticos estimula la secreción de VLDL-TG, por un lado, dirigiendo APOB (apolipoproteína B) lejos de la degradación y hacia la secreción, generando un aumento en el número de partículas de VLDL. Por otro lado, hay un aumento de la cantidad de TAG que se incorporan a la VLDL, causando un aumento en el tamaño de las partículas VLDL (Duval, et al. 2007). Siendo así, se podría esperar que el hígado de ratones con menor expresión de PPAR α muestren una síntesis anormalmente alta de VLDL-TAG así como reservas elevadas de TAG, por lo que habría una acumulación de lípidos en el hígado, lo cual podría estar asociado con patologías como la esteatosis hepática.

9. CONCLUSIÓN

El fotoperiodo irregular empleado para inducir desincronización no tuvo una función eficiente al menos sobre la regulación glucémica, pues no causó una alteración evidente sobre la tolerancia a la glucosa; sin embargo, hay pruebas de que sí tendría un impacto sobre la regulación metabólica hepática medida a través de la expresión de PPAR α , cuya expresión reducida bajo el fotoperiodo irregular, a su vez, tendría una influencia negativa sobre genes y proteínas involucradas en distintos procesos de regulación metabólica hepática. Por lo tanto, con base a estos resultados, el fotoperiodo empleado tendría impacto evidente únicamente sobre la regulación metabólica de lípidos y no sobre la regulación glucémica, siendo así, el modelo de fotoperiodo empleado no sería una referencia completamente eficiente como modelo para estudiar la desincronización sobre el ratón *N. alstoni*.

De acuerdo con lo anterior, se sugiere desarrollar estudios, herramientas y métodos más específicos sobre los tejidos involucrados en las vías metabólicas que puedan brindar una visión integral más amplia, así como inducir el fotoperiodo irregular por un tiempo más prolongado para evidenciar, más profundamente, el impacto del fotoperiodo irregular.

ANEXO 1. Permiso del comité de bioética



FACULTAD DE CIENCIAS

Facultad de Ciencias, UNAM
Cto. Exterior s/n, C.U., 04510
Ciudad de México, CDMX

CEARC

Oficio: CEARC/Bioética/02032020

Asunto: Dictamen/Proyecto/Investigación/P1202001002

Folio: PI_2020_01_002.

Nombre de la comisión: Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias.

Nombre del autor del protocolo: Dr. Manuel Miranda Anaya.

Título del proyecto: Efecto de la desincronización circadiana sobre la conducta y el metabolismo de ratones *Neotomodon alstoni*.

Fecha de recepción: 23 de enero de 2020.

Nombre de la institución y sede de la investigación: UMDI, Juriquilla, UNAM.

Estimado Dr. Manuel Miranda Anaya.

El subcomité de Bioética de la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias revisó el protocolo arriba mencionado, de acuerdo a la información proporcionada, el comité resolvió que tanto la metodología como los procedimientos de la investigación cumplen con los lineamientos bioéticos relacionados con el uso y manejo de organismos de laboratorio.

Los miembros del comité dan un dictamen favorable sobre la investigación y las formas de aplicación de los procedimientos.

Dictamen: APROBADO

ATE N T A M E N T E

"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, CDMX, a 2 de marzo de 2020.

Dr. Ricardo Noguera Solano

Coordinador de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias, UNAM. cearc@ciencias.unam.mx



CEARC
Comisión de Ética Académica
y Responsabilidad Científica
FC - UNAM



10. REFERENCIAS

1. Aarsland, A., and R.R. Wolfe. 1998. Hepatic secretion of VLDL fatty acids during stimulated lipogenesis in men. *J. Lipid. Res.* 39: 1280-1286.
2. Abellán, P., J. A. Madrid, J. M. Ordovás, and M. Garaulet. 2012. Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome. *Endocrinol. Nutr. (English Edition)*. 1:50–61.
3. Abranches, M., V. F.C. E. Oliveira. And J. Bressan. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor: effects on nutritional homeostasis, obesity and diabetes mellitus. *Nutr. Hosp.* 2.
4. Aguilar R. R. 2015. Introduction to circadian rhythms, clocks, and its genes. In: R. R. Aguilar, M. D. Muñoz, y M. L. F. Moles (Ed). *Mechanisms of circadian systems in animals and their clinical relevance*. Springer international publishing. Switzerland. p.1.
5. Aguilar, A. A. 2015. Introduction to circadian rhythms, clocks, and its genes. In Aguilar, R. R., D. M. Muñoz. And M. L. F. Moles; *Mechanisms of circadian systems and animals and their clinical relevance*. Springer, Pittsburgh, USA.
6. Alquier, T. and V. Poitout. 2018. Considerations and guidelines for mouse metabolic phenotyping in diabetes research. *Diabetologia*. 61: 526-538.
7. Alsahli, M., M. Z. Shrayyef., and J. E. Gerich. 2017. Normal glucose homeostasis. In: Poretsky, L. (eds), *Principles of diabetes mellitus*. Springer, Cham. P. 23-42.
8. Alvarez, T. and E. M. Aceves. 1993. Contribución al conocimiento de los hábitos alimentarios del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898). *Acta Zool. Mex.* 59 (n. s.):1-51.

9. Anaya, M. M., M.P. Mendoza, C.R. Juárez-Tapia, and A. C. Castro. 2018. The volcano mouse *Neotomodon alstoni* of central Mexico, a biological model in study of breeding, obesity and circadian rhythms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 273: 61-66.
10. Aronoff, A. L., K. Berkowitz., B. Shreiner., and L. Want. 2004. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin. *Diabetes spectr.* 3: 183-190.
11. Ayala, G. F., L. R. Vargas, J. I. Ramos, and G. Mexicano. 1998. Sleep patterns of the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Physiol. Behav.* 4: 577–580.
12. Benedé, U. R., V. O. Estévez., P. Ramodori., F. J. Cubero. And A. Nevzorova. 2020. Guidelines and considerations for metabolic tolerance tests in mice. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 13: 439-450.
13. Blume, C., C. Garbazza, and M. Spitschan. 2019. Effects of light on human circadian rhythms, sleep and mood. *Somnology (Berl).* 3: 147-156.
14. Buhr, E. D., and J. S. Takahashi. 2013. Molecular components of the mammalian circadian clock. In A. Kramer and M. Meroow, Editor, *Circadian clocks. Handb. Exp. Pharmacol.* Hofmann, München. p. 3.
15. Carpentier, Y. and L. Sobotka. 2008. Basics in clinical nutrition: Lipid metabolism. e-*ESPEN*, E. Spen Eur. E. J. Clin. Nutr. Metab. 5: 188-191.
16. Carvajal, K., M. L. Hernández-Esquivel, and R. M. Sánchez. 2007. PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardiaca. *Arch. Cardiol. Mex.* 4: 66-76.
17. Challet, E. 2019. The circadian regulation of food intake. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15: 393-405.
18. Charoensuksai, P., and W. Xu. 2010. PPARs in rhythmic metabolic regulation and implications in health and disease. *PPAR Res.* 2010.1-9.

19. Chen, L., and G. Yang. 2014. PPARs integrate the mammalian clock and energy metabolism. *PPAR Res.* 2014. 1-6.
20. Chiesa, J. J., M. L. Duhart, P. L. Casiraghi, N. Paladino, L. I. Bussi, and A. D. Golombek. 2015. Effects of circadian disruption on physiology and pathology: from bench to clinic (and back). In R. R. Águilar, M. D. Muñoz y M. L. F. Moles (Eds), *Mechanisms of circadian systems in animals and their clinical relevance*. Springer international publishing. Switzerland. p. 289.
21. Coll, T., R. R. Calvo, E. Borroso, L. Serrano, E. Eyre, X. Palomer, and M. V. Carrera. 2009. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) beta/ delta: A new potential therapeutic target for the treatment of tetabolic syndrome. *Curr. Mol. Pharmacol.* 1: 46-55.
22. Collins, L. C., P. J. Morgan. And A. M. Johnstone. 2020. Mealtime: a circadian disruptor and determinant of energy balance? *J. Neuroendocrinol.* 7: E12886.
23. Colwell, C. S. 2011. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat. Rev. Neurosci.* 12: 553-569.
24. Daan, S. 2009. A history of chronobiological concepts. In U. Albrecht (Ed), *The circadian Clock, Protein reviews*. Springer, New York, NY. p. 1-35.
25. De la Fuente, I. M. 2015. Elements of the cellular metabolic structure. *Front. Mol. Biosci.* 2: 1-16
26. DeBerardinis, R.J., and C. B. Thompson. 2012.. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell.* 6: 1132-1144.
27. Diatropov, M. E., M. V. Rutovskaya, E. V. Kusnetsova, M. A. Diatrptova, A. M. Kosyreva, D. S. Dzhalilova, E. A. Ponomarenko, V. A. Panchelyuga, and A. A. Stankevich. 2019.

- Infradian and ultradian rhythms of body temperature resumption during hibernation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2: 291-295.
28. Dinger, K., J. Mhor., C. Vohlen., D. Hiranu., E. R. Hucklenbruch., R. Ensenauer., J. Dötsch. And A. M. A. Alcazar. 2018. Intraperitoneal tolerance test, measurement of lung function, and fixation of the lung to study the impact of obesity and impaired metabolism in pulmonary outcomes. *J. Vis. Exp.* 133: 56685.
29. Duval, C., M. Müller. And A. kersten. 2007. PPAR α and dyslipidemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 8: 961- 971.
30. Feingold, K. R. 2021. Introduction to lipids and lipoproteins. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. Herder, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, J. Hofland, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, J. Purnell, F. Sinfer, C. A. Stratakis, D. L. Trence, and D. P. Wilson (Eds). Endotext [internet]. South Dartmouth (MA). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
31. Feingold, K. R. and C. Grunfeld. 2019. The effect of inflammation and infection on lipid and lipoproteins. In: Feingold, K. R., B. Anawalt. And A. Boyce (Eds). Endotexts [internet]. South Dartmouth (Massachusetts), Estados Unidos.
32. Fisk, A. S., S. K. Tam, L. A. Brown, V. V. Vyazovskiy, D. M. Bannerman, and S. N. Peirson. 2018. Light and cognition: roles for circadian rhythms, sleep, and arousal. *Front. Neurol.* 56: 1-18.
33. Floessner, T. and R. A. Hunt. 2017. Basic principles underlying biological oscillations and their entrainment. In V. Kumar (Ed), *Biological timekeeping: clocks, rhythms and behavior*. Springer, Delhi, India.

34. Fonken, L. K., T. G. Aubrecht., O. H. Meléndez-Fernández., Z. M. Weil. And R. J. Nelson. 2013. Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight. *J. Biol. Rhythms.* 4: 262-271.
35. Gervois, P., I. P. Torra, J. P. Fruchart, and B. Staels. 2000. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR Activators. *Clin. Chem.Lab. Med.* 1: 3-11.
36. Giugliano, D., A. Ceriello. and K. Esposito. 2008. Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 1: 217S – 222S.
37. Golombek, D. A., L. P. Casiraghi, P. V. Agostino, N. Paladino, J. M. Duhart, S. A. Plano, and J. J. Chiesa. 2013. The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *J. Physiol. Paris.* 4: 10–322.
38. Griffin, A. B. 2013. Lipid metabolism. *Surgery (Oxford).* 6: 267-272.
39. Güler, D. A., M. C. Altimus, L. J. Ecker, and S. Hattar. 2007. Multiple photoreceptors contribute to nonimage-forming visual functions predominantly through melanopsin containing retinal ganglion cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1: 509-515.
40. Han, L., W. J. Shen., S. Bittner., F. B. Kraemer. And A. Azhar. 2017. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiol.* 3: 279-296.
41. Hantzidiamantis, P. J. and S. L. Lappin. 2020. Physiology, glucose. National Library of medicine, National institutes of Health. StatPearls [Internet]. Treasure Island, Florida.
42. Heyde, I., and H. Oster. 2019. Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting. *Sci. Rep.* 20114 (2019): 1- 13.
43. Jha, P. K., E. Challet. And A. Kalsbeek. 2015. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418: 74-88.

44. Jingyi, Q., and F. A. J. L. Scheer. 2016. Circadian system and glucose metabolism: implications for physiology and disease. *Trends in Endocrinol. Metab.* 5: 281-293.
45. Jo, y., H. Okasaki, Y. Moon, and T. Zhao. 2016. Regulation of lipid metabolism and beyond. *Int. J. Endocrinol.* 2016: 1- 2.
46. Jorgensen, M. S., K. S. Tornqvist. And H. Havid. 2017. Calculation of glucose dose intraperitoneal glucose tolerance tests in lean and obese mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 1: 95-97.
47. Kalsbeek, A., S. Fleur. And E. Fliers. 2014. Circadian control of glucose metabolism. *Mol. Metabol.* 4: 372-383.
48. Kersten, S. 2008. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res.* 2008: 132960.
49. Ko, C. W., J. Qu, D. D. Black, D. and P. Tso. 2020. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17: 169-183.
50. Koukkari, L. W., and B. R. Sothorn. 2006. General features of rhythms: terminology and characteristics. In W. L. Koukkari and R. B. Sothorn, *Introducing biological rhythms.* Springer, Minnesota, USA. p. 19.
51. Kwan, C. H., F. Kronenberg, S. Beddhu, and A. K. Cheung. 2007. Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4: 1246-1261.
52. Li, P. 2011. Regulation of lipid metabolism. *Front. Biol.* 3: 171-171.
53. Liu, S., B. Hatano, M. Zhao, C. C. Yen, K. Kang, S. M. Reilly, M. R. Gangl, C. Gorgun, J. A. Balschi, J. M. Ntambi, and C. H. Lee. 2010. Role of peroxisome proliferator-activated receptor δ/β in hepatic metabolic regulation. *J. Biol. Chem.* 2: 1237–1247.

54. Ma, M. A. and E. H. Morrison. 2020. Neuroanatomy, nucleus suprachiasmatic. In StatPearls Publishing (Internet). Treasure Island (FL). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546664/>
55. Madrid, P. A. J. 2013. An introduction to chronobiology. In M. Garaulet and J. M. Ordovás (Eds), Chronobiology and obesity. Springer, New York, NY. p. 11.
56. Mancilla, R., A. Krook., P. Schrauwen., and M. K. C. Hesselink. 2020. Diurnal regulation of peripheral glucose metabolism: potential effects of exercise timing. Obesity Research. 1: S38-S45.
57. Marcheva, B., K. M. Ramsey., C. B. Peek., A. Affinati., E. Maury. And J. Bass. 2013. Circadian clocks and metabolism. In Kramer, A. and M. Meroz (Eds), Circadian clocks. Springer, Berlin, Germany.
58. Mazzoccoli, G., V. Paziienza, and M. Vinciguerra. (2012). clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. Chronobiol. Int. 3: 227–251.
59. Mehling, A., and J. W. Fluhr. 2006. Chronobiology: biological clocks and rhythms of the skin. Skin Pharmacol. Physiol. 4: 182-189.
60. Mendoza, M. P., J. B. Rivera-Zavala, A. H. Ridríguez-Guadarrama, L. M. Montoya-Gomez, A. C. Castro, M. D. Muñoz, and M. M. Anaya. 2018. Daily cycle in hepatic lipid metabolism in obese mice, *Neotomodon alstoni*: sex differences. Chronobiol. Int. 5: 643-657.
61. Montagner, A., A. Polizzi., E. Fouché., S. Ducheix., Y. Lippi., F. Lasserre., V. Barquissau., M. Régnier., C. Lukowicz., B. Céline., I. Fadila., M. J. Bertrand., T. Al Saati., P. Cano., L. L. Mselli., L. G. Mithieux., F. Rajas., S. Lagarrigue., T. Pineau., N. Loiseau., C. Postic., D. Langin., W. Wahli. And G. Hervé. 2016. Liver PPARalpha is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. Gut. 7: 1202-1214.

62. Münch, M., and V. Bromundt. 2012. Light and chronobiology: implications for health and disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 4: 448-453.
63. Nakanishi, S., M. Yoneda. And A. Maeda. 2013. Impact of glucose excursion and mean glucose concentration in oral glucose-tolerance test on oxidative stress among Japanese americans. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 6: 427-433.
64. Narjjs, F. and S. Rana. 2020. Metabolic implications of circadian disruption. *Pflugers Arch.* 5: 513-526.
65. National Center for Biotechnology Information. 2021. PubChem Compound summary for CID 9803963, Endurobol. PubChem [Internet].
66. Nguyen, P., V. Leray, M. Diez, S. Serisier, L. J. Bloc'h, B. Siliart, and H. Dumon. 2007. Liver lipid metabolism. *J. Anim. physiol. Anim. Nutr.* 3: 272- 283.
67. O'connor, C. M. and J. U. Adams. 2010. *Essentials of cell biology.* NPG, education. Cambridge, MA
68. Ogedegbe, H. O., and D. W. Brown. 2001. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and their disease associations. *Lab. Med.* 7: 384-389.
69. Oster, H. 2010. Circadian clocks and metabolism. In Albrecht, U. (Ed), *The circadian clock.* Springer, Freiburg, Switzerland.
70. Paglialunga, S., and C. A. Dehn. 2016. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 1: 159.
71. Patsouris, D., R. Janardan., M. Müller. and S. Kersten. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *3: 1508-1516.*

72. Pawlak, M., P. Lefebvre. And B. Staels. 2015. Molecular mechanism of PPAR α action and impact in lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 3: 720-733.
73. Peeters, A. and M. Baes. 2010. Role of PPAR α in hepatic carbohydrate metabolism. *PPAR Res.* 2010: 1-12.
74. Petersen, C. M. and I. G. Shulman. 2018. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol. Rev.* 98: 2133-2223.
75. Poggiogalle, E., H. Jamshed, and C. M. Peterson. 2017. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. *Metab.: Clin. Exp.* 84: 11- 27.
76. Potter, G. D., J. E. Cade, P. J. Grant, and L. J. Hardie. 2016. Nutrition and the circadian system. *Br. J. Nutr.* 3: 434-442.
77. Rakhshandehroo, M., B. Knoch, M. Müller, and S. Kersten. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 2010. 1-20.
78. Refinetti, R. 2016. *Circadian physiology*. Taylor and Francis Group, Idaho, USA. P. 3.
79. Reiter, J. R., X. Liu, X. C. L. Manchester, A. S. R. Corral, X. D. Tan, and P. A. J. Madrid. 2013. Processes underlying chronodisruption and their proposed association with illness. In M. Garaulet and J. M. Ordovás (Eds), *Chronobiology and obesity*. Springer, New York, NY. p. 55.
80. Repiso, C. G. 2015. Lipogénesis y gluconeogénesis en el intestino delgado con obesidad mórbida. Tesis doctoral. Universidad de Málaga, España.
81. Robinson, J. L., P. Kocabas., H. Wang., P. E. Cholley., D. Cook., A. Nilsson., M. Anton., R. Ferreira., I. Domenzain., V. Billa., A. Limeta., A. Hedin., J. Gustafsson., E. J. Kerkhoven., L. T. Svensson., B. O. Palsson., A. Mardinoglu., L. Hansson., M. Uhlén., J. Nielsen. 2020. An atlas of human metabolism. *Sci. Signal.* 624: 1482.

82. Sakaguchi, K., K. Takeda., M. Maeda., W. Ogawa., T. Sato., S. Okada., Y. Ohnishi., H. Nakajima., A. Kashiwagi. 2016. Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance. *Diabetol. Int.* 1: 53-58.
83. Saltiel, A. and C. Kahn. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414:799-806.
84. Sarkisian, B., N. J. Gupta, and S. Panda. 2017. Circadian clocks, metabolism and food-entrained rhythms. In V. Kumar (Ed), *biological timekeeping: clocks, rhythms and behavior*. Springer, New Delhi, India. P. 443.
85. Schwartz, W. L., and S. Daan. 2017. Origins: a brief account of the ancestry of circadian biology. In V. Kumar (Ed), *Biological timekeeping: clocks, rhythms and behavior*. Springer, New Delhi, India. p. 3.
86. Sehgal, A. (Ed). 2004. *Molecular biology of circadian rhythms*. John Wiley and Sons, New Jersey, USA.
87. Sellix, M. T. 2016. The circadian timing system and endocrine physiology. In M. L. Gumz (Ed), *Physiology in health and disease*. Springer, New York, NY. p. 57.
88. Stubblefield, J. and B. Green (Eds). 2016. Mammalian circadian clocks and metabolism: navigating nutritional challenges in a rhythmic world. In L. Gumz (Ed), *physiology in health and disease*. Springer, New York, NY. p. 153.
89. Tahara, Y. and S. Shibata. 2015. Circadian rhythm and food/nutrition. In R. R. Aguilar, M. D. Muñoz y M. L. F. Moles (Eds), *Mechanisms of circadian systems in animals and their clinical relevance*. Springer International publishing, Switzerland. P. 237.
90. Tracey, T.J., F. J. Steyn, E. J. Wolvetang, and S. T. Ngo. 2018. Neural lipid metabolism: multiple pathways driving functional outcomes in health and disease. *Front. Mol. Neurosci.* 10:1-25.

91. Uauy, R., J. I. Martínez. And C. V. B. Rojas. 2000. Molecular nutrition: regulation of lipid metabolism by peroxisome proliferator activated receptors (PPAR), their relationship to obesity and diabetes mellitus. *Rev. Méd. Chile.* 4.
92. Vetter, C. 2018. Circadian disruption: What do we actually mean? *Eur. J. of Neurosci.* 51. 531-550.
93. Wang, Y., T. Nakajima., F. J. González. And N. Tanaka. 2020. PPARs as metabolic regulators in the liver: lessons from liver-specific PPAR-null mice. *Int. J. Mo. Sci.* 6: 2061.
94. Weaver, D. R. 2016. Introduction to circadian rhythms and mechanisms of circadian oscillations. En M. L. Gumz (Ed), *Physiology in health and disease.* Springer, New York, NY. p. 1.
95. Wilcox, G. 2005. Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem.* 2: 19-39.
96. Xie, Y., Q. Tang., G. Chen., M. Xie., S. Yu., J. Zhao, and L. Chen. 2019. New insights into de circadian rhythm and its related diseases. *Front. Physiol.* 10: 682.
97. Xu, J., G. Xiao., C. Trujillo., V. Chang., L. Blanco., S. B. Joseph., S. Bassilian., M. F. Saads., P. Totonoz., W. N. P. Lee. And I. J. Kurland. 2002. Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) influences substrate utilization for hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.* 52: 50237- 50244.
98. Yang, G., Z. Jia, T. Aoyagi, C. McClain, R. M. Mortensen, and T. Yang. 2012. Systemic PPAR γ deletion impairs circadian rhythms behavior and Metabolism. *PLoS One.* 8: e38117.
99. Yang, X., A. K. Lamia, and M. R. Evans. 2007. Nuclear receptors, metabolism, and the circadian clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72: 387-394.
100. Yao, Y., L. Ding, and X. Huang. 2019. Diverse functions of lipids and lipid metabolism in development. *Small Methods.* 7: 1-18.

101. Zhong, L. X., X. N. Li., G. Y. Yang., W. X. Li., Q. Q. Chang., P. Huan-Xin., H. H. Zhang., M. Y. Zhou., Y. D. Wnag., W. W. Zhang., Q.S. Hu., W. Zgu. And B. Zhang. 2019. Circadian misalignment alters insulin sensitivity during the light phase and shifts glucose tolerance rhythms in female mice. PLoS ONE. 12: e0225813.

Dirección General de Bibliotecas UAQ